

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Gita Nováková

**Vliv nádorových fibroblastů na přežívání, proliferaci a invazivitu
nádorových buněk**

Effect of cancer-associated fibroblasts on the survival, proliferation and invasiveness
of cancer cells

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Ladislav Anděra, CSc.

Praha, 2012

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat svému školiteli RNDr. Ladislavu Anděrovi, CSc. za cenné připomínky a rady, které mi pomohly při zpracování této bakalářské práce, a v neposlední řadě i za jeho velkou trpělivost. Poděkování patří také Mgr. Jarmile Špegárové, Ph.D. za její pomoc a vstřícný přístup při mých začátcích v laboratoři.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 11. května 2012

ABSTRAKT

Nádorové mikroprostředí představuje, vedle vlastních nádorových buněk, strukturně i funkčně významnou součást nádoru. Obdobně jako v orgánech je i toto prostředí je vytvářeno několika buněčnými typy (fibroblasty, buňkami imunitního systému, endoteliálními buňkami aj.) a nebuněčnou složkou (především extracelulární matrix). Všechny tyto součásti formují vhodné prostředí pro vlastní nádorové buňky – podporují jejich růst a množení, brání imunitnímu systému v jejich zničení a zabezpečují i jejich výživu. Jednu z hlavních složek nádorového mikroprostředí představují nádorové fibroblasty. Vznikají z různých buněčných typů (stávajících fibroblastů, endoteliálních buněk, epiteliálních buněk atd.) vlivem faktorů produkovaných nádorovými buňkami (především TGF- β). Tyto aktivované nádorové fibroblasty (cancer associated fibroblasts, CAFs) exprimující α -SMA nejsou z tkáně odstraňovány podobně jako fibroblasty účastníci se reparačních procesů. Naopak v tkáni přetrvávají a produkují řadu pro-nádorových faktorů, mezi nejvýznamnější patří SDF-1, HGF, IGF-1, IL-6, VEGF, PDGF-C, TGF- β , MMPs aj. CAFs a jimi sekretované faktory ovlivňující téměř všechny znaky nádoru, tzv. Hallmarks of Cancer – podporují proliferaci nádorových buněk, brání jejich vstupu do apoptózy, podporují tvorbu cévního zásobení nádoru, aktivně přetváří okolní prostředí, čímž zvyšují invazivitu nádorových buněk a chrání je před imunitním systémem. Současně CAFs poskytují nádorovým buňkám energeticky bohaté substráty. Dosud málo prozkoumanou funkci nádorových fibroblastů představuje vytváření vhodného prostředí pro nádorové kmenové buňky. Mají schopnost indukovat v ostatních buňkách fenotyp kmenových buněk a aktivně regulovat jejich diferenciaci. Díky svému rozsáhlému vlivu na progresi nádoru se CAFs staly cílem intenzivního výzkumu nových terapeutických přístupů k léčbě onkologických pacientů.

Klíčová slova:

nádorové mikroprostředí, apoptóza, nádorové buňky, nádorové fibroblasty, sekretované faktory, nádorová terapie

ABSTRACT

Tumour microenvironment, in addition to cancer cells themselves, represents important structural and functional part of the tumour. Similarly to the normal organs tumour microenvironment comprises several cell types (fibroblasts, immune cells, endothelial cells etc.) and non-cellular components, particularly extracellular matrix. All of them form favourable conditions for the growth, proliferation, protection from the immune system-mediated destruction and nutrition of cancer cells. Cancer associated fibroblasts (CAFs) represent the most abundant cell type of tumour microenvironment. Their origin can be traced to local normal fibroblasts, endothelial cells or epithelial cells and the transition into the CAFs phenotype is influenced with several factors secreted by cancer cells (particularly TGF- β). In contrast to fibroblasts activated during wound healing newly formed cancer associated fibroblasts expressing α -SMA are not subsequently eliminated from the respective tissue. They persist and produce a number of pro-tumorigenic factors – SDF-1, HGF, IGF-1, IL-6, VEGF, PDGF-C, TGF- β , MMPs etc. CAFs and their secreted factors target several signalling pathways enhancing basic characteristics of the tumour, so called Hallmarks of Cancer. Cancer associated fibroblasts promote proliferation and invasiveness of cancer cells, prevent them from apoptosis, enhance angiogenesis and protect cancer cells from being destructed by immune cells. Moreover they provide cancer cells with energy-rich substrates. CAFs are now considered also as important regulators of the stem phenotype of cancer stem cells. Due to their extensive influence on the tumour progression, CAFs (their activation and CAFs-influenced signaling) represent an important target for new, effective anti-tumour therapies.

Keywords:

tumour microenvironment, apoptosis, cancer cells, cancer-associated fibroblasts, secreted factors, cancer therapy

1.OBSAH

1.	OBSAH	5
2.	ÚVOD	6
3.	NÁDOR A NÁDOROVÉ MIKROPROSTŘEDÍ	7
3.1	Vlastnosti nádoru	7
3.2	Nádor jako orgán	8
3.2.1.	Nádorové buňky	9
3.2.2.	Buňky imunitního systému	10
3.2.3.	Endoteliální buňky	11
3.2.4.	Fibroblasty a extracelulární matrix.....	12
4.	NÁDOROVÉ FIBROBLASTY	13
4.1	Základní charakteristika nádorových fibroblastů	14
4.2	Původ CAFs	14
4.2.1.	Mesenchymálně-mesenchymální přechod	15
4.2.2.	Epiteliálně-mesenchymální přechod	16
4.2.3.	Endoteliálně-mesenchymální přechod.....	16
4.3	Role CAFs v rozvoji nádoru	17
4.3.1.	Změny v buněčném metabolismu	18
4.3.2.	Podpora proliferace nádorových buněk.....	20
4.3.3.	Přetváření okolního prostředí a podpora invazivity nádorových buněk.....	21
4.3.4.	Zvýšení rezistence nádorových buněk vůči apoptóze	22
4.3.5.	Podpora krevního zásobení nádoru	23
4.3.6.	Ochrana nádorových buněk před imunitním systémem.....	25
4.3.7.	Vytváření specifického prostředí pro nádorové kmenové buňky	25
4.4	Možnosti terapie	27
5.	DISKUZE	29
6.	ZÁVĚR	31
7.	SEZNAM ZKRATEK.....	32
8.	CITOVANÁ LITERATURA.....	34

2. ÚVOD

Nádorová onemocnění patří celosvětově mezi jedny z hlavních příčin úmrtí. Jejich studiu je proto věnována velká pozornost. V 80. letech 20. století byl poprvé prokázán vliv okolního prostředí, tzv. nádorového mikroprostředí, na rozvoj nádoru. Výzkum se poprvé intenzivně zabýval nádorovým mikroprostředím jako důležitou součástí celého nádoru a významným regulátorem jeho vývoje. Byly identifikovány jeho hlavní součásti i řada mediátorů jejich vlivu. Po rocích výzkumu a mnoha publikovaných studiích zájem o výzkum role nádorového mikroprostředí poněkud upadl. V posledních letech však, jak dokumentují mnohé recentní publikace, nastává renesance tohoto výzkumu a objasnění role nádorového mikroprostředí je nejen předmětem intenzivního základního výzkumu, ale promítá se i do výzkumu aplikovaného.

Nádor není oproti původním představám jednoduchým shlukem rychle se dělících buněk, ale spíše vysoce specializovaným orgánem, na jehož stavbě se podílí mnoho buněčných typů i nebuněčných složek:

- vlastní nádorové buňky, buňky tvořící cévní řečiště, buňky imunitního systému, fibroblastické buňky
- extracelulární matrix, cytokiny, chemokiny, růstové faktory aj.

Jedním z buněčných typů podílejících se na stavbě nádorového mikroprostředí jsou i fibroblasty. Protože se svými vlastnostmi liší od fibroblastů vyskytujících se ve zdravých tkáních, označují se jako tzv. nádorové fibroblasty (angl. cancer associated fibroblasts). Okruh jejich působení je nesmírně široký – mají vliv na vznik, růst, přežívání, invazivitu i výživu nádoru.

Cílem této práce je shrnout dosavadní poznatky o vlivu nádorových fibroblastů na nádorové buňky a stručně nastínit možnosti, které tyto poznatky znamenají pro léčbu nádorových onemocnění. Protože je vliv nádorových fibroblastů úzce spjat i s ostatními složkami nádorového mikroprostředí, je jim na začátku práce věnována zvlášť kapitola.

3. NÁDOR A NÁDOROVÉ MIKROPROSTŘEDÍ

Dle klasické definice je nádor patologický útvar tvořený tkání, jejíž růst se vymkl kontrole organismu a roste na něm nezávisle (Vokurka et al., 2007). Mutace genů v těchto nádorových buňkách jsou z velké části zodpovědné za tuto nádorovou transformaci. Uvedené mutace nejčastěji postihují geny podílející se na regulaci proliferační schopnosti buněk. Příčiny vzniku nádorů jsou velmi různorodé a souvisí jak s genetickou výbavou, tak i prostředím a stylem života. Mezi hlavní rizikové faktory spojované se vznikem rakoviny patří například externí faktory jako např. záření, infekce (virového, bakteriálního nebo hlístového původu), různé chemické látky (karcinogeny), nevhodná strava, fyzický stav, hormonální změny a v neposlední řadě také genetické predispozice (Allen et al., 2005). Dle statistik lze vznik až 95 % všech nádorů přičíst externím faktorům (Anand et al., 2008). Přestože může k nádorové transformaci buňky dojít v kterékoliv tkáni, nejčastější místa vzniku nádorů představují ty, kde dochází k velmi rychlému množení buněk a jejich obnově (tkáň trávicí a dýchací soustavy), a místa pod výraznou hormonální kontrolou (prostata, vaječníky nebo prsy).

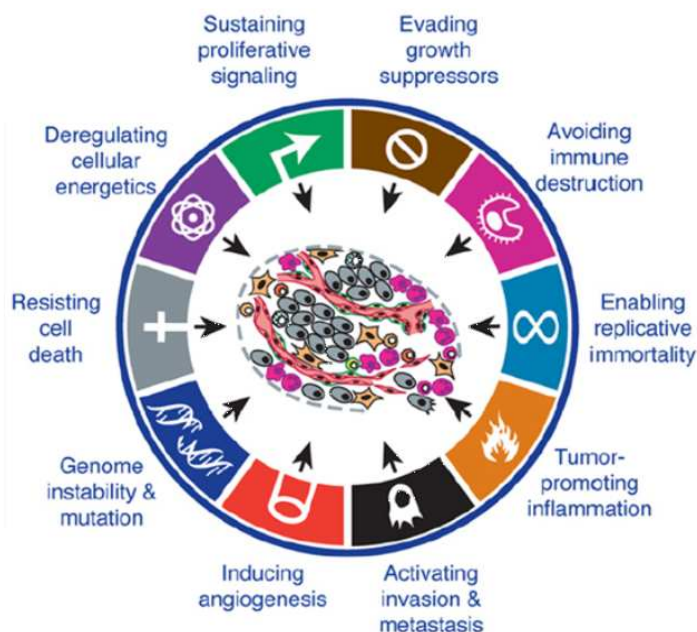
3.1 Vlastnosti nádoru

Kvůli obrovské rozmanitosti jednotlivých typů nádorů a komplexitě zapojených procesů nebylo jednoduché princip tohoto onemocnění v obecné rovině blíže popsat. Srozumitelný a poměrně systematický přístup navrhli ve své práci Hanahan a Weinberg, kteří popsali celkem osm znaků rakoviny (tzv. Hallmarks of Cancer) a dva spouštěcí mechanismy vedoucí ke vzniku nádoru (Hanahan and Weinberg, 2011), viz Obr. 1.

V první práci z roku 2000 Hanahan a Weinberg poprvé popsali šest základních znaků či schopností, které nádoru umožňují růst a dál se rozšiřovat. Jedná se o 1) podporu proliferace, 2) zvýšenou rezistenci k signálům potlačujícím růst, 3) vyhnutí se buněčné smrti, 4) podporu cévního zásobení, 5) neomezený replikační potenciál a 6) schopnost pronikání do jiných tkání a vytváření metastáz (Hanahan and Weinberg, 2000). V roce 2011 k původním znakům přibýly čtyři nové: 7) pozměněný energetický metabolismus, 8) vyhnutí se zničení imunitním systémem, 9) genomová nestabilita spojená s akumulací mutací a v neposlední řadě 10) prozánětlivé prostředí pevných nádorů (Hanahan and Weinberg, 2011).

Nestabilita genomu a mutace představují logický zdroj variability, se kterou roste pravděpodobnost, že nějaká buňka získá vlastnosti umožňující vznik nádoru. Zatímco je vliv mutací na možný vznik nádoru na první pohled poměrně jasný a srozumitelný, u zánětu tomu

tak není. Za normálních okolností je zánět odpovědí organismu na různá poškození a ve svém výsledku by měl jedince touto reakcí chránit. Současně ale buňky podílející se na tomto procesu svou aktivitou vytváří ideální podmínky pro vznik nádorových onemocnění. Do okolního prostředí se dostávají látky, které podporují obnovu poškozené tkáně – především růstové faktory podporující proliferaci buněk, proangiogenní faktory podporující tvorbu cévního zásobení, enzymy působící na ECM nebo faktory potlačující buněčnou smrt (Grivennikov et al., 2010).



Obr. 1 Hallmarks of Cancer dle Hanahana a Weinberga. Schéma zobrazuje původních šest navržených znaků a dva znaky doplněné později. Tyto charakteristiky by měly být společné pro všechny typy nádorů. Na obrázku jsou vyznačeny i dva mechanismy (nestabilita genomu a mutace, zánět), jejichž aktivace je potřebná pro vznik nádoru (Hanahan and Weinberg, 2011).

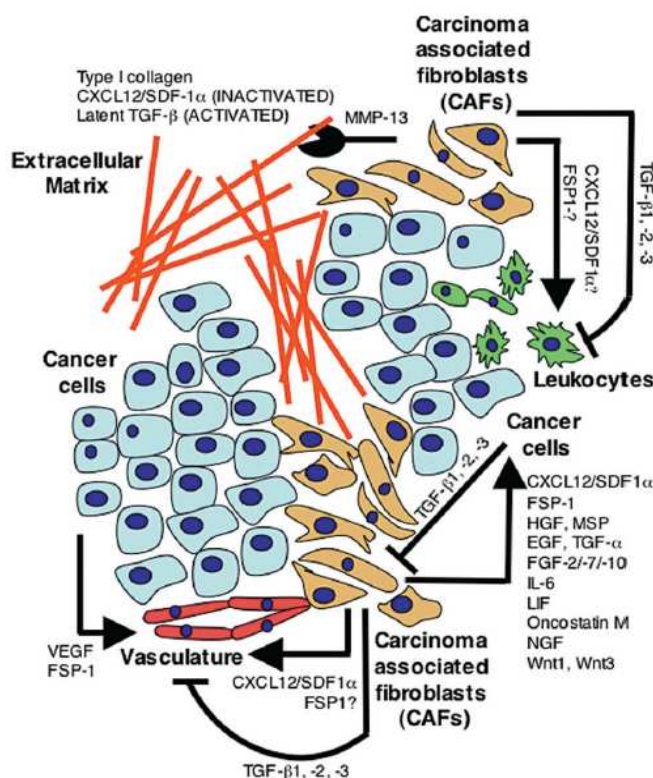
3.2 Nádor jako orgán

Nádor není útvar složený pouze z jednoho typu buněk, ale jedná se o komplexní systém obsahující jak vlastní nádorové buňky, tak i buňky tzv. nádorového mikroprostředí (stromatu). Význam tohoto mikroprostředí byl poprvé názorně demonstrován v 80. letech dnes již klasickými *in vivo* pokusy s kuřecími embryi a virem Rousova sarkomu. Onkogenní potenciál viru se neprojevil, byla-li virem infikována zdravá kuřecí embrya. Jiného výsledku bylo dosaženo, byla-li embrya poraněna a tím – jak se později zjistilo – byly aktivovány složky mikroprostředí, které hrály při vzniku nádoru významnou roli (Dolberg et al., 1985).

Nádorové stroma je heterogenní a mimo vlastních nádorových buněk obsahuje: fibroblasty, myofibroblasty, endoteliální buňky, pericyty, leukocyty (makrofágy, eozinofily, NK-buňky,

lymfocyty), a extracelulární matrix. Typické složení nádorového prostředí se liší podle konkrétního nádorového typu. Poměr vlastního nádorového parenchymu a stromatu dává nádoru jeho některé vlastnosti. Na základě poměru nádorového parenchymu a stromatu se např. rozlišují nádory tvrdé (s vysokým podílem vaziva) a měkké (s nízkým podílem vaziva).

Obr. 2 znázorňuje základní složky nádoru a molekuly, jejichž prostřednictvím mezi sebou komunikují.



Obr. 2 Buňky nádorového mikroprostředí mezi sebou komunikují prostřednictvím sekretovaných růstových faktorů, chemokinů a cytokinů. Na obrázku jsou schematicky znázorněny některé z těchto významných faktorů i se směrem jejich působení. Šipky znázorňují aktivující funkci, ohrazené čáry funkci inhibující, vykousnutý ovál funkci proteolytickou (Egeblad et al., 2005).

3.2.1. Nádorové buňky

Vlastní nádorové buňky tvoří základ celého nádoru. Stojí na počátku jeho vzniku a nesou o něm informaci ve svém genomu, kterou mohou předávat dál. Produkují faktory mající vliv na rozvoj jejich okolí – přitahují vzdálené buňky do místa nádoru, spouští dráhy zodpovědné za změny v jejich fenotypu i funkci atd.

Pevné nádory byly po dlouhou dobu považovány za uniformní, amorfní masu buněk, ale ukazuje se, že mohou do určité míry vykazovat orgánovou hierarchii. To samé platí i pro vlastní nádorové buňky.

Heterogenita nádorů byla prokázána pomocí xenotransplantací různých populací nádorových buněk. Při nich bylo zjištěno, že pouze jejich malá část je schopna iniciovat v příjemci vznik nádoru a jeho růst (Horton and Huntly, 2012). V současné době je obecně přijímána teorie, že stejně jako v případě zdravých tkání, existují i v nádorových tkáních dvě populace buněk: buňky již diferencované a tzv. nádorové kmenové buňky (cancer stem cells, CSCs). Přestože se po dlouhou dobu jejich existence předpokládala, poprvé byly nádorové kmenové buňky popsány a identifikovány ve vzorcích z akutní myeloidní leukémie v roce 1997 (Bonnet and Dick, 1997). V následujících letech byly CSCs popsány i u jiných nádorových typů – např. glioblastomů, nádorů prsu, tlustého střeva, plic, prostaty nebo vaječníků (Garvalov and Acker, 2011). Tyto CSCs se svými vlastnostmi podobají normálním kmenovým buňkám. Velmi pomalu se (asymetricky) dělí, což znesnadňuje většinu terapií mířených na dělící se buňky (Motlík et al., 2007). Otázka původu nádorových kmenových buněk zatím nebyla uspokojivě objasněna. Diskutuje se o dvou způsobech jejich vzniku – mohou vznikat z normálních kmenových buněk, ve kterých došlo k patologickým změnám, nebo z již částečně diferencovaných buněk, které tak získávají charakter kmenových buněk. Kmenové buňky včetně CSCs si pro zachování svého fenotypu musí udržovat kontakt se svým prostředím. Pokud jsou z tohoto prostředí vytrženy, začínají se velmi rychle diferencovat a přecházejí do senescence (Walker et al., 2009). Jejich dlouhodobá kultivace je proto v podmínkách *in vitro* velmi obtížná.

Identifikace odlišných populací nádorových buněk poskytuje důležité informace i pro onkologickou léčbu, která je v současnosti stále mířena primárně proti již diferencovaným nádorovým buňkám. Kmenové buňky jsou přitom vůči této léčbě velmi odolné a po čase jsou schopny způsobit relaps nádoru.

3.2.2. Buňky imunitního systému

Hlavní rolí buněk imunitního systému je zejména ochrana organismu proti vnějším negativním vlivům (např. bakteriálním či virovým infekcím), ale evidentně ovlivňují i nádorová onemocnění a to jak negativně (aktivní eliminace nádoru cytotoxickými buňkami), tak i pozitivně (zánět, sekrece některých anti-apoptotických či pro-proliferčních cytokinů). Mezi buněčné typy nejvíce ovlivňované chemokiny a mající hlavní význam pro rozvoj nádorů patří makrofágy, dendritické buňky a T-buňky. Přirozená imunitní reakce těchto buněk proti nádorovým buňkám je vlivem nádorového mikroprostředí a faktorů jím produkovaných potlačena, buňky se nediferencují a neaktivují (Waldner et al., 2006). Naopak produkují

faktory podporující růst nádoru, např. EGFs, VEGF, FGFs, metaloproteázy atd. Jak již bylo dříve zmíněno, je za jeden z kritických bodů pro rozvoj nádoru považován vznik zánětu, který má za normálních okolností do postižené oblasti přivést buňky nutné pro opravu poškozené tkáně. Chronické záněty ale v tomto prostředí vytváří naopak dobré podmínky pro vznik a rozvoj nádoru. Makrofágy představují jednu z hlavních složek nádorového mikroprostředí podílejících se na zánětlivých reakcích klíčových pro vznik nádoru (Colotta et al., 2009). Tím ale jejich role během růstu nádoru nekončí. Nádorové buňky vůči nim exprimují specifické signály (např. chemokin CCL2), které je aktivují – vznikají z nich tzv. tumor associated macrophages (TAMs). TAMs po své aktivaci produkují řadu faktorů podporujících růst, invazivitu a angiogenezi nádoru, např. EGF (epidermal growth factor), TGF- β , VEGF nebo různé metaloproteázy degradující ECM (Erren et al., 2011). Makrofágy jsou v tkáních zodpovědné za cílenou likvidaci označených buněk. Nádorové buňky exprimují vůči makrofágům signály „eat me“ (calreticulin) (Chao et al., 2010/a) i „don't eat me“ (antigen CD47) (Chao et al., 2010/b). Na příkladu akutní lymfoblastické leukémie (ALL) bylo *in vitro* i na myších modelech prokázáno, že blokace antigenu CD47 dokáže znovu aktivovat fagocytózu ALL buněk makrofágy a vede k účinné eliminaci těchto buněk z nádorové tkáně (Chao et al., 2011). Podobné pokusy a molekuly nabízejí slibný přístup k léčbě lymfoblastické leukémie v budoucnosti.

3.2.3. Endoteliální buňky

Vliv endoteliálních buněk na nádor se projevuje dvěma základními cestami – přímou interakcí s nádorovými buňkami a utvářením cévního zásobení nádoru. Hlavní úlohou endoteliálních buněk je vytváření cévního systému zásobujícího tkáně včetně rostoucích pevných nádorů. Důležitost dostatečného cévního zásobení pro růst nádoru a vytváření metastáz byla popsána již před 40 roky (Folkman, 1971). Vytváření cévního řečiště – angiogeneze je pro nádorovou tkáň důležitým procesem umožňujícím přívod potřebného kyslíku a živin k nádoru a odvod odpadních produktů vznikajících z metabolických procesů rychle se dělících buněk (Naumov et al., 2006).

Krevní řečiště je v dospělém organismu již víceméně vytvořeno, nové cévy vznikají (kromě pravidelných změn během ovulačního cyklu u žen) jen ve výjimečných případech, kdy dojde ke zranění. Aby v nové regenerované tkáni vznikly plně funkční cévy, musí být tento proces přísně regulovaný. Nádorová tkáň se často vyznačuje chaotickým a předimenzovaným cévním systémem, který vzniká v důsledku konstitutivní exprese proangiogenních faktorů. Takové

krevní řečiště tak často ani není schopno plnit svou funkci. Tento systém pak spíše vytváří prostředí, které nádorové buňky nutí migrovat do jiných míst (kvůli nedostatečnému zásobení potřebnými látkami) a současně jim tuto migraci i umožňuje (De Bock et al., 2011). Už před více než deseti lety byla prokázána pozitivní korelace mezi hustotou krevního řečiště a vyšší incidencí metastatického šíření nádoru (Kumar and Fidler, 1998), což souhlasí s výše uvedeným konceptem.

Tvorba krevního zásobení ale není jen náhodným dějem ze strany endoteliálních buněk. Nádorové buňky aktivně exprimují faktory (např. VEGF), které tvorbu cévního řečiště podporují a směřují určeným směrem (k nádoru). Nádorové tkáně obecně vykazují zvýšenou produkci chemokinů s minimálně dvěma typy vlivů – nejprve se podílí na degradaci bazální membrány obklopující krevní cévu, poté na migraci endotelových buněk do místa nádoru a jejich proliferaci (Iivanainen et al., 2003). Dle nejnovějších poznatků jsou i nádorové buňky samy schopné přeměnit se v endoteliální buňky a vytvářet vlastní krevní zásobení. Zatím byla tato schopnost prokázána na příkladu nádorových buněk glioblastomů (Wang et al., 2010).

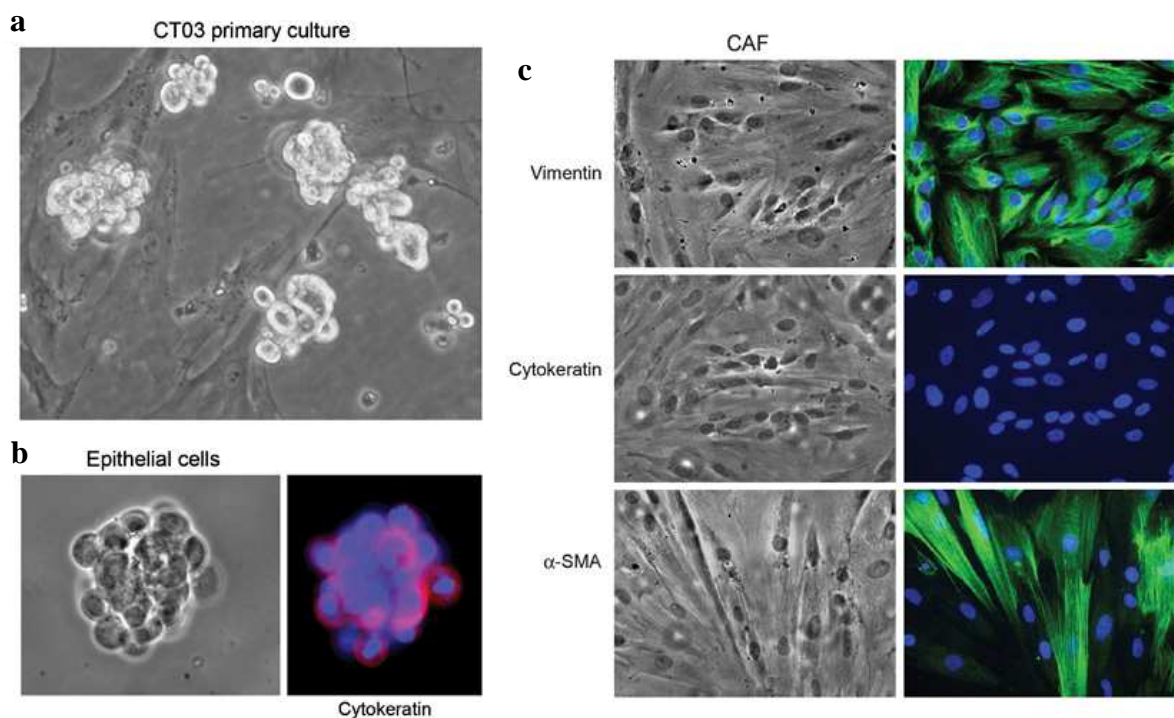
3.2.4. Fibroblasty a extracelulární matrix

Fibroblasty a extracelulární matrix spolu velmi úzce souvisí. Extracelulární matrix je struktura složená z různých makromolekul – kolagenu, proteoglykanů, lamininu, fibronektinu a kyseliny hyaluronanové – a podílí se na mnoha fyziologických procesech – podporuje prostorové uspořádání buněk, reguluje migraci, diferenciaci a proliferaci buněk. Její aktivní přetváření je proto důležitým procesem během růstu a dalšího vývoje nádoru (Zamecnik, 2005). Fibroblasty jsou v nádorovém stromatu zodpovědné za produkci složek extracelulární matrix, stejně tak ale exprimují metaloproteinázy (MMPs), které ji degradují, nebo různé růstové faktory, chemokiny, cytokiny atd. V poslední době jim je i pro jejich terapeutický potenciál věnována velká pozornost, a proto se na ně a jejich význam při vývoji nádoru podrobněji soustředím v následujících kapitolách.

4. NÁDOROVÉ FIBROBLASTY

Významnou část nádorového stroma tvoří fibroblasty. Normální fibroblasty jsou ale současně také hlavní buněčnou složkou pojivových tkání. V první řadě jsou zodpovědné za tvorbu extracelulární matrix, která tvoří velkou část těchto tkání. Fibroblasty jednak syntetizují její hlavní součásti (kolagen, laminin, fibronectin) (Rodemann and Müller, 1991), jednak produkují enzymy (metaloproteázy několika typů), které tuto matrix degradují (Martins et al., 2012). Jejich další úloha spočívá v hojení ran a regulaci zánětlivých reakcí (Tomasek et al., 2002). Ve zdravých tkáních jsou obě tyto funkce – syntetická i degradační – v rovnováze, fibroblasty jen velmi málo proliferují a udržují si nízkou metabolickou aktivitu. Po aktivaci, např. v důsledku poranění tkáně, se ale jejich proliferační i sekreční schopnost významně zvyšuje (Darby et al., 1997). Aktivované fibroblasty jsou současně schopny exprimovat a do svého okolí sekretovat řadu chemokinů podporujících příliv bílých krvinek do místa zranění (Nirodi et al., 2000). Po zahojení se počet fibroblastů v tkáni snižuje a zbývající fibroblasty se mění zpět na málo proliferující buňky s nízkou metabolickou aktivitou.

U některých typů nádorů tvoří fibroblasty nejčastější buněčný typ (např. u nádoru prsu či prostaty). V případě fibroblastů vyskytujících se v nádorovém mikroprostředí se hovoří o tzv. nádorových fibroblastech (cancer associated fibroblasts, CAFs).



Obr. 3 Záběry z mikroskopu zachycující nádorové kolorektální buňky a CAFs, 400x zvětšeno (a). Pod tímto obrázkem jsou vidět samotné nádorové kolorektální buňky utvářející 3D struktury a (c) CAFs značené třemi různými markery (pro vimentin, cytokeratin a α -SMA) (Chao et al., 2012).

4.1 Základní charakteristika nádorových fibroblastů

CAFs jsou velmi často přirovnávány právě k fibroblastům, které jsou aktivovány během fibrózy a hojení. Oba typy fibroblastů produkují α -SMA (α -smooth muscle actin) nebo E-DA fibronektin (Tomasek et al., 2002). Mezi oběma typy se ale vyskytují výrazné rozdíly – zatímco po zahojení přecházejí myofibroblasty do apoptózy a jsou tak z tkáně odstraňovány (Desmouliere et al., 1995), v případě CAFs se jedná o ireverzibilní aktivaci (Eyden et al., 2009).

Pro identifikaci CAFs ve vzorcích se používají kombinace detekovatelných markerů, pro které jsou CAFs pozitivní. Jedná se například o:

- již zmíněný α -SMA (α -smooth muscle actin),
- dále γ -SMA (γ -smooth muscle actin),
- palladin 4Ig (cytoskeletální protein),
- TEM1/CD248/endosialin (transmembránový protein),
- vimentin (součást intermediárních filament),
- podoplanin (transmembránový protein),
- kadherin-11 (adhezivní molekula) a další (Xouri and Christian, 2010).

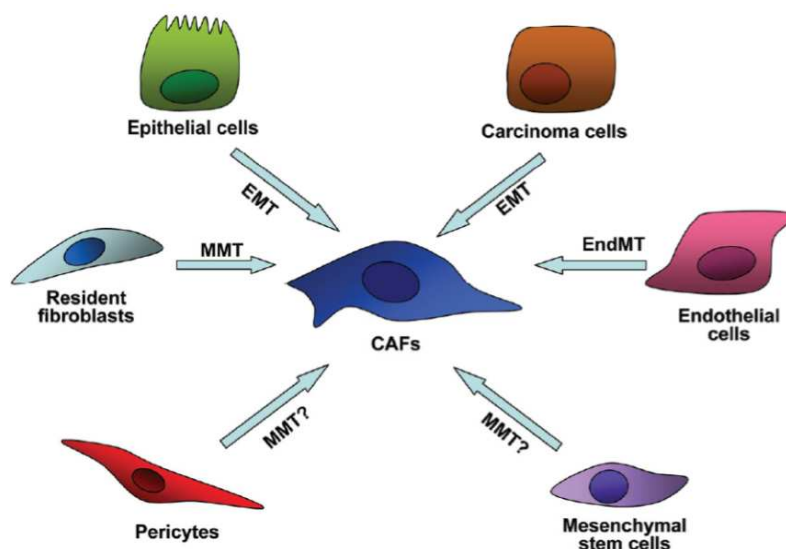
Naopak pro řadu epiteliálních (např. cytokeratin) nebo endoteliálních (např. CD31) markerů zůstávají CAFs většinou negativní.

4.2 Původ CAFs

Za hlavní zdroj CAFs byly dlouhou dobu považovány ostatní fibroblasty nacházející se v blízkosti nádorových buněk. Přestože jsou stávající fibroblasty stále považovány za jeden ze zdrojů CAFs, postupně se ukázalo, že nádorové fibroblasty mohou vznikat i z mnoha jiných buněčných typů. Jejich původ se může lišit mezi jednotlivými typy nádorů i u různých lokalizovaných nádorů. CAFs vznikají aktivací stávajících lokálních fibroblastů nebo i přeměnou jiných buněčných typů (makrofágů, endotelových buněk, pericytů nebo mesenchymálních kmenových buněk). Tato aktivace, resp. přeměna je reakcí na signály nádorových buněk, kterými tyto buňky aktivně ovlivňují své okolí. Mezi hlavní faktory exprimované nádorovými buňkami, které se podílí na přeměně buněk v CAFs, patří TGF- β (transforming growth factor- β) a PDGF (platelet-derived growth factor). Zatímco TGF- β je sám schopný indukovat vlastní přeměnu různých buněčných typů v CAFs, za hlavní funkci

PDGF je považována schopnost přivést fibroblasty a jiné mesenchymální buňky do místa nádoru.

CAFs mohou vznikat: 1) mesenchymálně-mesenchymální přechodem (MMT), 2) epiteliálně-mesenchymálním přechodem (EMT) a 3) endoteliálně-mesenchymálním přechodem (EndMT).



Obr. 4 Různé cesty vzniku CAFs. CAFs se mohou diferencovat z lokálních mesenchymálních buněk – fibroblastů, pericytů, mesenchymálních kmenových buněk (MMT), z epiteliálních a transformovaných nádorových buněk (EMT) nebo endoteliálních buněk (EndMT) (Cirri and Chiarugi, 2011).

4.2.1. Mesenchymálně-mesenchymální přechod

Mesenchymálně-mesenchymální způsob vzniku CAFs je charakteristický přeměnou různých buněčných typů mesenchymálního původu (fibroblastů, pericytů, buněk hladkých svalů atd.) na CAFs (Kojima et al., 2010). Mechanismus této přeměny byl popsán na základě experimentů prováděných *in vitro* a souvisel se zvýšenou produkcí růstových faktorů vlastními nádorovými buňkami. Tyto faktory následně iniciovaly přeměnu stávajících fibroblastů v CAFs projevující se produkcí α -SMA, zvýšenou proliferací a zvýšenou sekrecí extracelulární matrix. Mezi popsané růstové faktory podílející se na této transformaci patří TGF- β (transforming growth factor- β) (Bi et al., 2012), PDGF (platelet-derived growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor) (Denk et al., 2003) nebo IL-6 (interleukin-6) (Giannoni et al., 2010). Aktivace CAFs je regulována změnami redoxního potenciálu. Dráhy aktivované TGF- β vedou k produkci reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) v CAFs a ty pak mají vliv na uspořádání cytoskeletu v buňkách. CAFs vlivem ROS získávají fenotyp typický pro myofibroblasty a současně mezi nimi dochází k redukci gap junctions. Vliv této regulace

je patrný i z dat popisujících schopnost antioxidantů inhibovat aktivace CAFs i jejich protumorogenní vlastnosti (Cat et al., 2006).

4.2.2. Epiteliálně-mesenchymální přechod

Další cestou vzniku CAFs je transformace epiteliálních buněk. Epiteliální buňky jsou buňky polarizované – je na nich rozeznávána část apikální a část bazální nasedající na bazální membránu. Buňky jsou navzájem propojené těsnými spoji. Při transformaci buňky tento fenotyp ztrácí a stávají se z nich nepolarizované buňky mesenchymálního typu, schopné migrace a exprese komponent extracelulární matrix (Radisky et al., 2007). Během přechodu dochází k degradaci bazální membrány a k významným změnám ve struktuře cytoskeletu původně epiteliálních buněk (např. aktinový cytoskelet je nahrazen stresovými vlákny, cytokeratin v intermediárních filamentech je nahrazen vimentinem) (Micalizzi et al., 2010). Mezi aktivátory signálních drah vedoucích k EMT patří například HGF (hepatocyte growth factor), EGF (epidermal growth factor), PDGF nebo TGF- β (Kalluri and Weinberg, 2009).

Epiteliálně-mesenchymální přechod bývá často spojován se schopností metastatického šíření nádorových buněk. Díky této transformaci se mohou nádorové epiteliální buňky šířit do okolních tkání včetně hematopoietického systému a migrovat na větší vzdálenosti prostřednictvím krevního řečiště (Micalizzi et al., 2010). Kromě již zmíněného významu EMT pro progresi a invazivitu nádoru, se zdá, že tento přechod sehrává úlohu i při dalších dějích podporujících růst nádoru – zřejmě při něm vznikají buňky (s fenotypem nádorových kmenových buněk) schopné iniciovat vznik nádoru na nových místech a faktory podílející se na regulaci EMT pravděpodobně způsobují zvýšenou rezistenci těchto buněk vůči chemoterapii (Frederick et al., 2007) i vstupu do senescence (Ansieau et al., 2008).

4.2.3. Endoteliálně-mesenchymální přechod

Endoteliálně-mesenchymální přechod je charakterizován ztrátou typických endoteliálních markerů, např. CD31/PECAM nebo VE-kadherin, a naopak expresí typicky mesenchymálních markerů, např. FSP-1 nebo α -SMA. Endoteliální buňky jsou lokalizovány v jednovrstevnatých strukturách, ze kterých se uvolňují a pronikají skrze basální membránu do okolních tkání (Zeisberg et al., 2007). Podobně jako v předchozích případech i u EndMT hraje významnou roli faktor TGF- β (Yoshimatsu and Watabe, 2011).

4.3 Role CAFs v rozvoji nádoru

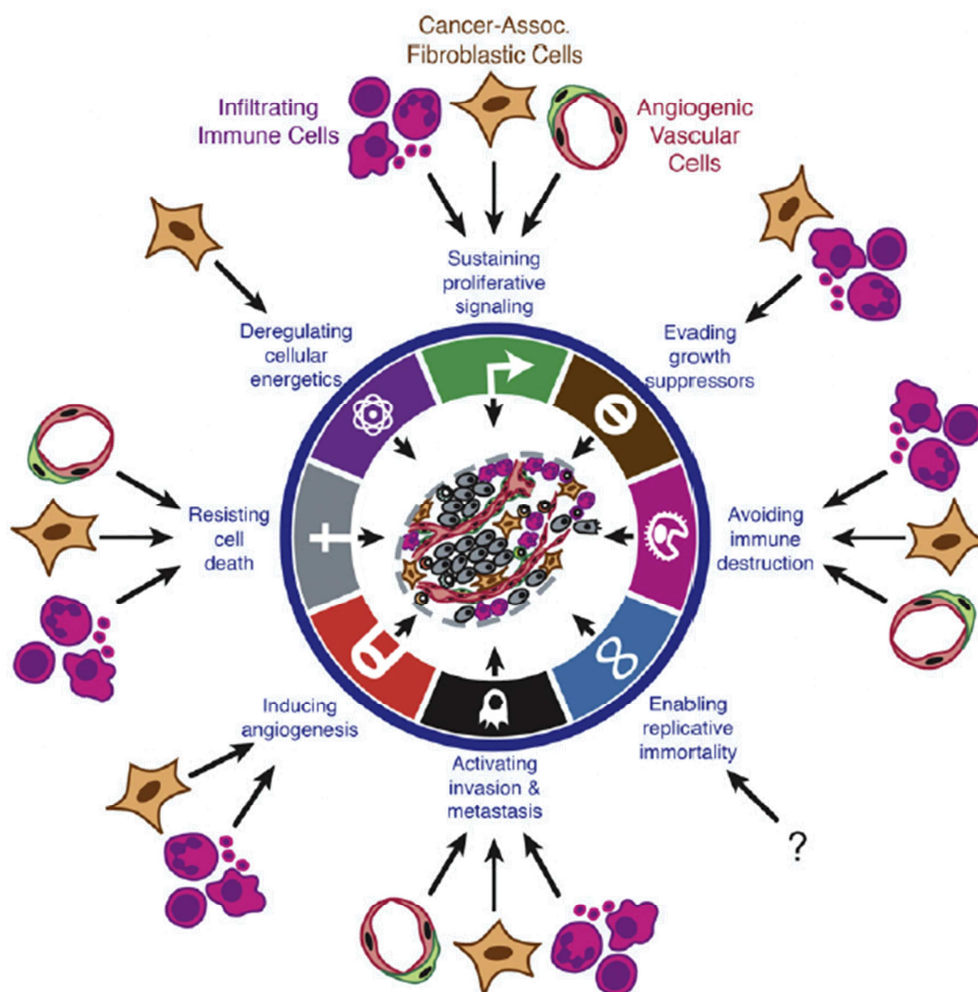
Nádorové fibroblasty bezesporu hrají významnou pozitivní roli v udržování a rozvoji nádorů. Jejich aktivní role v rozvoji nádorů a udržování jejich homeostáze je prokázána v mnoha původních pracech. Například xenotransplantace imortalizovaných prostatických epiteliálních buněk do imunodeficitních myší vedla k tumorigenezi jen v případě, kdy byly tyto buňky co-transplantovány společně s CAFs. Pokud ale byly tyto buňky transplantovány samotné nebo v kombinaci s normálními lidskými fibroblasty k rozvoji nádoru vůbec nedošlo. CAFs měly tedy čistě stimulační efekt na imortalizované, pre-nádorové prostatické buňky, ale nebyly schopny indukovat nádorovou transformaci (růst v imunodeficitních myších) u neimortalizovaných normálních prostatických buněk (Olumi et al., 1999).

Podobně jako u jiných komponent nádorového mikroprostředí, není ani vliv fibroblastů hned od počátku čistě pronádorový. V časně fázi tumorigeneze fibroblasty růst nádoru naopak inhibují, což je přikládáno především vzájemnému úzkému propojení aktivovaných fibroblastů pomocí gap junctions. Dochází tak prakticky k mechanické bariéře rozvoje nádoru a jeho invazivity. Jak bylo popsáno výše, dochází po čase k redukci těchto propojení, a to především vlivem faktorů produkovaných vlastními nádorovými buňkami. Ve svém pozdějším vývoji už fibroblasty růst nádoru naopak podporují (Omori et al., 2001).

Oblast působení CAFs na vlastní nádorové buňky i okolí je velmi široká. Obecně by se daly cíle jejich působení rozdělit do šesti komplexních procesů ovlivňujících téměř všechny charakteristické rakovinné znaky dle Hanahana a Weinberga, jak naznačuje i Obr. 5:

- změny v metabolismu nádorových buněk
- podpora proliferace nádorových buněk
- přetváření okolního prostředí (extracelulární matrix)
- podpora invazivity nádorových buněk
- zvýšení rezistence nádorových buněk vůči apoptóze
- podpora krevního zásobení nádoru
- ochrana nádorových buněk před imunitním systémem

Další roli sehrávají CAFs i při vytváření specifického prostředí pro nádorové kmenové buňky. Všechny zmíněné funkce CAFs jsou pro vznik, růst i další rozvoj nádoru důležité a nelze některé z nich nadřazovat nad ostatní.



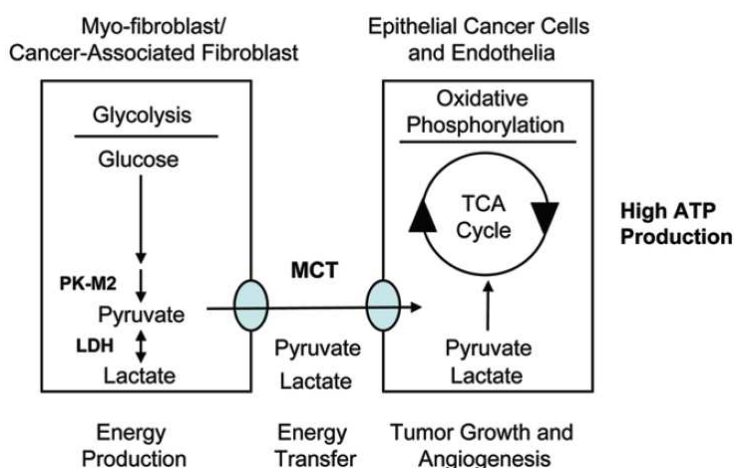
Obr. 5 Schéma popisující příspěvek stromálních buněk základním znakům nádoru, jak byly popsány Hanahanem a Weinbergem. Stromální buňky jsou zde zjednodušeně rozděleny do tří základních skupin – buněk imunitního systému, fibroblastických buněk a buněk podílejících se na tvorbě cévního zásobení (Hanahan and Coussens, 2012).

4.3.1. Změny v buněčném metabolismu

Pro nádorové buňky a jejich přežívání je velmi významná kooperace metabolismu CAFs s metabolismem nádorových buněk. Podle původní a dodnes přijímané hypotézy využívají nádorové buňky větší či menší měrou k tvorbě ATP vedle oxidativní fosforylace též glykolýzu, a to i za přítomnosti a dostatku kyslíku. Tento fakt byl poprvé popsán německým fyziologem Otto H. Warburgem, po kterém se tento jev nazývá Warburgův efekt (Warburg, 1956). To, k jakému typu metabolismu se buňka přikloní, záleží na konkrétní formě pyruvát kinázy (PK) – za přítomnosti formy PKM1 dochází v buňce k oxidativní fosforylaci, v případě PKM2 naopak k aerobní glykolýze (Christofk et al., 2008). Důvody pro tento přesmyk v základním metabolismu směrem k méně energeticky výhodné dráze zatím nebyly s určitostí prokázány. Původní hypotéza předpokládala, že je tento efekt důsledkem

nedostatečné funkčnosti mitochondrií a tím i dýchacího řetězce, která je způsobena nutností přizpůsobit se hypoxickým podmínkám mnoha nádorů (Warburg, 1956).

V nedávné době byl popsán podíl CAFs na metabolismu nádorových buněk a v návaznosti na již známý Warburgův efekt byl tento jen nazván „obrácený“ Warburgův efekt (reverse – Warburg effect). Tento koncept byl inspirován publikovanými výsledky, podle kterých se na procesu aerobní glykolýzy podílí v přinejmenším stejné míře i myofibroblasty (Vincent et al., 2008). CAFs se po kontaktu s nádorovými buňkami diferencují, snižují expresi caveolinu-1 (delecí genu pro caveolin-1 nebo jeho potlačením v důsledku oxidativního stresu) a stabilizují hladinu transkripčního faktoru HIF-1. Pod vlivem exprese PKM2 a laktát dehydrogenázy produkují laktát a pyruvát, který dále přes specifické přenašeče transportují do nádorových buněk. V nich pyruvát vstupuje již do Krebsova cyklu a dále do dýchacího řetězce. Nádorové buňky tímto mechanismem získávají výhodu v podobě přísunu energeticky bohatého substrátu, který jim umožní efektivnější a rychlejší proliferaci (Pavlidis et al., 2012).



Obr. 6 „Obrácený“ Warburgův efekt. Epiteliální nádorové buňky působí na okolní stromální buňky a spouští v nich tzv. Warburgův efekt – tj. stromální buňky zužitkovávají glukózu prostřednictvím glykolýzy, čímž dochází ke vzniku laktátu a pyruvátu. Tyto vysokoenergetické substráty jsou pomocí přenašečů (MCT) dopraveny do nádorových buněk, kde vstupují do Krebsova cyklu. Nádorové buňky tímto mechanismem získávají rychle dostupný zdroj energie, který mohou rychle a s vysokým energetickým výtěžkem využít (Pavlidis et al., 2009).

Pozitivní vliv spřažení metabolismů nádorových a stromálních buněk na růst nádoru byl potvrzen i pokusy, ve kterých byly myším transplantovány lidské nádorové buňky (z nádoru prsu) a CAFs (wild type nebo Cav-1(-/-)). Pozitivní vliv Cav-1(-/-) fibroblastů byl potlačen použitím inhibitorů glykolýzy (Bonuccelli et al., 2010). Uvedená práce naznačuje možný potenciál výzkumu léků cílených na CAFs jako na zdroj energetických substrátů.

4.3.2. Podpora proliferace nádorových buněk

Zvýšená proliferace nádorových buněk je jedním ze základních principů vzniku nádoru a představuje klíčový krok i pro jeho další rozvoj (např. invazivitu). Přestože samy nádorové buňky produkují faktory, které jejich růst a proliferaci podporují, k podobné činnosti stimulují i okolní buňky. Na zvýšené proliferaci nádorových buněk se tak podílí všechny části nádorového mikroprostředí. CAFs sekretují řadu růstových faktorů a cytokinů působících na okolní nádorové buňky – HGF, TGF- β , SDF-1, IGF-1, IL-6, FGF, EGF aj.

Exprese HGF (hepatocyte growth factor) byla pozorována u mnoha nádorů, např. prsu, plic, žaludku nebo slinivky. Zvýšená exprese HGF a jeho receptoru c-Met je spojována se zhoršenou prognózou pro pacienta. HGF aktivuje více signálních drah, které podporují proliferaci a přežití buněk, vyváření cévního zásobení, migraci i invazivitu nádorových buněk – jedná se především o aktivaci MAPK (mitogen-activated protein kinase) a PI3K/Akt signálních drah, které sehrávají důležitou roli při regulaci buněčné proliferace a přežívání (Knowles et al., 2009).

Růstový faktor IGF-1 (insulin-like growth factor-1) je jedním z přirozených aktivátorů MAPK a PI3K/Akt signálních kaskád a stejně jako HGF tak podporuje proliferaci a přežívání nádorových buněk. V některých typech nádorů (např. melanomech) nejsou nádorové buňky schopny IGF-1 samy exprimovat a jsou tak zcela závislé na IGF-1 sekretovaném CAFs (Lewis et al., 2010).

Dalším proliferačním faktorem exprimovaným CAFs je IL-6 (interleukin-6). IL-6 je exprimován i dalšími buňkami nádorového mikroprostředí, především myeloidními buňkami a T-lymfocyty. Jeho efekt je velmi široký. Podporuje proliferaci nádorových buněk obdobným způsobem jako výše uvedené faktory – skrze aktivaci PI3/Akt signální kaskády (Quante et al., 2011). Kromě nádorových epiteliálních buněk působí IL-6 i na buňky imunitního systému. Regulací diferenciace pomocných T-lymfocytů se podílí na udržování chronického zánětu, a tím i setrvalé produkci růstových faktorů a cytokinů podporujících růst a přežívání nádorových buněk (Grivennikov et al., 2009).

I ostatní faktory sekretované CAFs působí na nádorové buňky podobným způsobem. Ústřední motiv jejich působení představuje deregulace základních signálních drah regulujících průchod buněčným cyklem – především Ras/Raf/MAPK kaskády a PI3K/Akt kaskády.

S funkcí CAFs coby buněk podporujících proliferaci úzce souvisí i jejich role při zvyšování invazivity nádorových buněk.

4.3.3. Přetváření okolního prostředí a podpora invazivity nádorových buněk

Šíření nádorových buněk do dalších míst je velmi komplexní proces, na kterém se podílí všechny složky nádorového mikroprostředí i nádorové buňky samotné.

Nedílnou složku nádorového mikroprostředí představuje i její nebuněčná část – extracelulární matrix. CAFs aktivně modelují okolní prostředí, čímž vytvářejí prostor pro nádorové buňky – pro jejich růst a migraci. Jednou ze základních funkcí všech fibroblastů je produkce složek extracelulární matrix a faktorů (proteáz), které tuto matrix zase odbourávají. Za normálních podmínek jsou tyto dvě funkce v rovnováze a nedochází tak ani k významnému úbytku ECM ani její nadměrné produkci. CAFs ve velké míře sekretují metaloproteázy (MMPs) i jejich aktivátory, které následně štěpí složky extracelulární matrix a jejich zvýšená exprese je spojena se zvýšenou invazivitou nádoru (Gao et al., 2010).

Kromě různých metaloproteáz exprimují CAFs i tzv. seprázu (syn. FAP, fibroblasts activation protein), která patří mezi serinové proteázy. Její význam pro růst nádoru byl popsán už v počátcích výzkumu nádorového mikroprostředí, kdy byla jeho exprese detekována u 90 % stromálních buněk (především CAFs) v rámci epitelálních nádorů (Garin-Chesa et al., 1990). FAP svou kolagenázovou a peptidázovou aktivitou narušuje strukturu ECM a tak podporuje invazivitu nádorových buněk. Ze studie analyzující vliv FAP u pacientů s diagnostikou různě pokročilého kolorektálního nádoru vyplývá, že podporující efekt FAP je největší u časných a malých nádorů, zatímco u nádorů rozvinutějších je vliv FAP omezený a jeho roli přebírají jiné faktory (Henry et al., 2007). Dle současných publikovaných výzkumů je FAP exprimován i na povrchu vlastních nádorových buněk (např. u nádorových pankreatických (Shi et al., 2012) nebo gliomových buněk). Především gliomovým nádorovým buňkám exprese FAP zřejmě umožňuje snadnější pronikání extracelulární matrix, která má jinak velmi specifickou stavbu bránící cizím buňkám do mozku pronikat a poškozovat ho (Mentlein et al., 2011).

V nádorovém mikroprostředí tak vzniká velký tlak na degradaci ECM, která umožňuje vznik nového cévního zásobení nebo šíření nádorových buněk (Vosseler et al., 2009).

Na zvyšování invazivity nádorových buněk se CAFs nepodílí jen prostřednictvím degradace extracelulární matrix, ale i sekrecí faktorů, které zvýšenou invazivitu v nádorových buňkách indukují. Mezi hlavní faktory působící v tomto směru patří TGF- β nebo HGF (hepatocyte growth factor).

V nádorových buňkách musí nejprve dojít ke změnám v jejich fenotypu – epiteliálně-mesenchymálnímu přechodu, které jim umožní migrovat do dalších tkání a je spoluzodpovědný

za nádorovou invazivitu. Vliv CAFs na buňky karcinomu prsu byl popsán například ve studii Lebreta a kol., ve které byly pozorovány výrazné rozdíly ve fenotypu nádorových buněk kultivovaných v CAFs vs. NMFs (normal mammary fibroblasts) kondiciovaném médiu. Buňky vystavené faktorům produkovaným CAFs prodělaly významnou změnu své morfologie směrem k mesenchymálnímu typu buněk a na první pohled byla patrná zvýšená migrační kapacita těchto buněk (Lebret et al., 2007). TGF- β je jedním z faktorů produkovaných CAFs a podílejících se na EMT. Zřejmě se tak prostřednictvím EMT podílí na zvýšené invazivitě nádorových buněk (Chaffer and Weinberg, 2011).

Role HGF při zvýšené proliferaci nádorových buněk byla naznačena už v předchozí části. HGF sekretovaný fibroblasty se ale mimoto podílí i na zvýšené invazivitě nádorových buněk. V nádorových buňkách HGF indukuje sekreci uPA a jeho receptoru. Ty jsou součástí systému podílejícího se na remodelaci okolních tkání a tak i podporujícího invazivitu buněk. Tento proinvazivní efekt uPA/uPAR byl zkoumán například při *in vitro* experimentech na buňkách hepatocelulárního karcinomu, kdy aplikace inhibitorů uPAR invazivitu nádorových buněk snížily (Lee et al., 2008).

4.3.4. Zvýšení rezistence nádorových buněk vůči apoptóze

Normální zdravé buňky mají mnoho mechanismů, kterými regulují svůj buněčný cyklus, jehož součástí je i buněčná smrt. Nádorové buňky se snaží těmito kontrolním mechanismům vyhnout a aktivně blokují (mutace, dalece, inaktivace) komponenty a dráhy pro-apoptotické signalizace či zvyšují expresi anti-apoptotických proteinů. Na zvýšené rezistenci nádorových buněk vůči apoptotickým signálům se podílí i nádorové mikroprostředí, včetně CAFs. Způsoby tohoto působení CAFs jsou dvě – sekrece anti-apoptotických faktorů nebo produkce složek ECM, jejichž interakce s nádorovými buňkami aktivuje dráhy vedoucí k potlačení procesů vedoucích k apoptóze.

Mezi faktory sekretované CAFs a potlačující vstup nádorových buněk do apoptózy patří především IGF-1. IGF-1 aktivuje PI3K/Akt kaskádu, která ve svém výsledku uvolňuje z komplexu Bcl-2/Bad anti-apoptotický protein Bcl-2, který brání aktivaci procesů vedoucích k apoptóze (Valenciano et al., 2012). IGF-1 nemá jen anti-apoptotický vliv, ale jak již bylo zmíněno, podílí se i na regulaci proliferace nádorových buněk. Ve svém výsledku tak IGF-1 způsobuje zvýšenou proliferaci nádorových buněk, podporuje jejich přežívání a zabraňuje jejich vstupu do apoptózy. V mnoha provedených experimentech byla zjištěna zvýšená rezistence těchto buněk vůči léčbě ozařováním a s tím i horší prognóza. Například u skupiny

pacientů s diagnózou rakoviny děložního hrdla byla před zahájením léčby analyzována míra exprese IGF-1 a po léčbě radiochemoterapií byly tyto výsledky porovnány s vyvíjejícím se stavem pacienta. U pacientů s vyšší expresí IGF-1 byla pozorována horší dlouhodobá prognóza pro pacienty (Lloret et al., 2007). IGF-1 proto představuje velmi důležitý faktor mající význam jak pro diagnostiku, tak pro vývoj potenciální léků.

Anti-apoptotické signály složek ECM jsou zprostředkovány transmembránovými adhezivními molekulami – integriny (Lenci et al., 2012). Mezi ligandy těchto integrinů patří např. fibronectin, laminin nebo kolagen typu I. Integriny regulují expresi anti-apoptotických proteinů a zvyšují tím rezistenci nádorových buněk vůči apoptóze. Na příkladu lidských leukemických buněk byl pozorován inhibiční vliv β -integrinu na aktivaci kaspázy-8, která je jedním z klíčových kroků vedoucích k buněčné smrti (Estrugo et al., 2007).

Zvýšená rezistence nádorových buněk vůči apoptóze hraje důležitou roli především při léčbě nádorových onemocnění. Pro nádorové buňky představuje možnost tuto léčbu přežít, pro pacienta naopak zvýšenou pravděpodobnost relapsu.

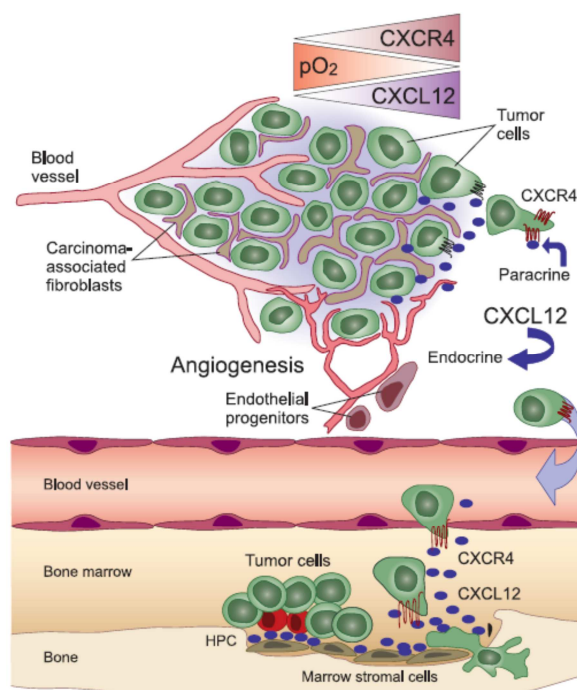
4.3.5. Podpora krevního zásobení nádoru

Dostatečné krevní zásobení nádoru představuje jednu ze základních podmínek umožňujících dlouhodobý růst nádoru i jeho další šíření. Na signalizaci indukující vytváření nového cévního zásobení mají nezanedbatelný vliv vlastní nádorové buňky. Postupně byl však prokázán i podíl nádorového mikroprostředí a jeho jednotlivých složek, CAFs nevyjímaje. CAFs produkují řadu proangiogenních faktorů, např. VEGF, FGF-2, IL-8 nebo PDGF-C. Kromě vlastní produkce uvedených faktorů, CAFs degradací ECM (např. prostřednictvím MMP-13) uvolňují proangiogenní faktory (např. VEGF), které tak mohou interagovat s cílovými receptory na endoteliálních buňkách (Lederle et al., 2010).

VEGF je klasický proangiogenní faktor sekretovaný různými buňkami nádorového mikroprostředí i nádorovými buňkami samotnými. VEGF a jeho receptory představují také cíle onkologické léčby mířené na omezení cévního zásobení nádoru. U mnoha pacientů se ale po čase vytváří rezistence vůči těmto lékům. V roce 2009 byl popsán jeden z možných mechanismů jejího vzniku, podpořený pokusy na myších modelech lymfomů. Nádorové buňky vystavené terapii cílené vůči VEGF stimulují CAFs, které začnou produkovat PDGF-C, který přejímá místo inhibovaného VEGF úlohu při podpoře tvorby cévního zásobení nádoru (Crawford et al., 2009). K podobným výsledkům dospěly i obdobné experimenty

zaměřené na glioblastomy (di Tomaso et al., 2009). PDGF-C tak představuje důležitý proangiogenní faktor sekretovaný CAFs, který potvrzuje význam nádorového mikroprostředí schopného nahradit některé funkce nádorových buněk a omezovat efekt nádorové léčby.

Na tvorbě cévního zásobení se CAFs podílí i sekrecí SDF-1/CXCL12. SDF-1 (Stromal Derived Factor 1, syn. CXCL12) patří k homeostatickým chemokinům. Spolu se svým receptorem CXCR4 patří k důležitým molekulám ve fyziologických procesech lidského těla. Tato signalizace je v normálních tkáních zodpovědná za směřování hematopoietických kmenových buněk do kostní dřeně, která je hlavním zdrojem CXCL12 u dospělého člověka. V nádorových tkáních SDF-1 působí mimo jiné jako proangiogenní faktor podporující tvorbu krevního zásobení nádoru a jeho výživu (Orimo et al., 2005). Interakce CXCL12 sekretovaného fibroblasty a CXCR4 exprimovaného na povrchu nádorových buněk indukuje v těchto buňkách produkci VEGF podporujícího tvorbu cévního zásobení nádoru. Podpora angiogeneze byla prokázána například pokusy s buňkami s geneticky odstraněným CXCR4, které byly xenotransplantovány spolu s endotelovými buňkami do imunodeficientních myší. V případě těchto buněk byla pozorována výrazně menší vaskularizace tkání a současně i menší invazivita rakovinných buněk (v tomto případě byly pokusy prováděny s buňkami gliomu) (Ping et al., 2011).



Obr. 7 Působení CXCL12 (SDF-1) a jeho receptoru CXCR4 na tvorbu cévního zásobení a metastázi. Za hypoxických podmínek se exprese CXCL12 i CXCR4 zvyšuje. Působení CXCL12 je dvojitý: 1) CXCL12 působí parakrinně na nádorové buňky prostřednictvím CXCR4 a tím přímo podporuje jejich růst a 2) CXCL12 současně přitahuje endoteliální progenitorové buňky do místa nádoru a tím podporuje vznik cévního zásobení nádoru (Burger and Kipps, 2006).

4.3.6. Ochrana nádorových buněk před imunitním systémem

Imunitní systém má za úkol vyhledávat a poté i odstraňovat buňky potenciálně škodlivé, mezi které samozřejmě patří i nádorové buňky. Ty si proto proti němu musely vyvinout účinné obranné mechanismy, díky kterým je tento systém buď nerozezná, nebo jejichž prostřednictvím aktivitu imunitních buněk potlačí. Na těchto obranných mechanismech se podílí i nádorové mikroprostředí včetně CAFs.

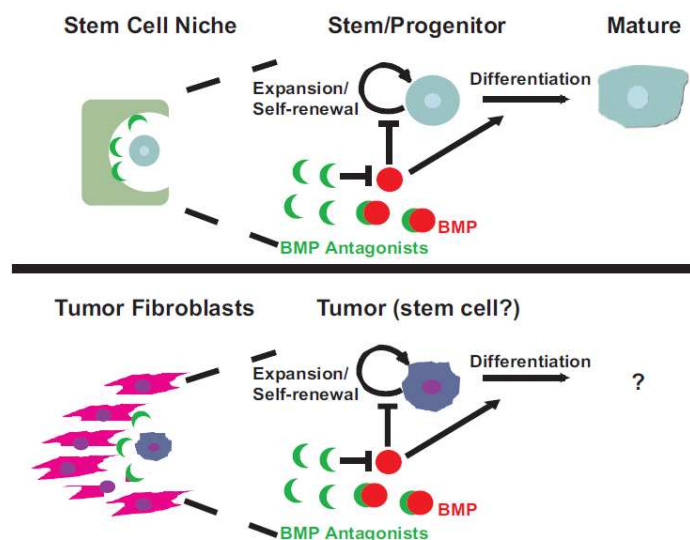
Mezi jimi exprimované faktory patří např. imunosupresivní cytokin TGF- β (Flavell et al., 2010). TGF- β je antagonistou interleukinu-15 (IL-15), který je důležitým regulátorem buněčných procesů v cytotoxických T-lymfocytech (CD8⁺ lymfocytech) i NK-buňkách – reguluje jejich proliferaci, aktivaci i přežívání. Zatímco IL-15 podporuje přežívání CD8⁺ lymfocytů, TGF- β způsobuje jejich smrt – inhibuje expresi anti-apoptotického Bcl-2 proteinu indukovanou IL-15. TGF- β tak velmi účinně potlačuje imunitní odpověď zprostředkovanou cytotoxickými T-lymfocyty (Sanjabi et al., 2009). Aktivované NK-buňky do svého okolí exocytují pro-apoptotické faktory, které způsobují smrt nádorových buněk. Aktivace NK-buněk je indukována znovu pomocí IL-15 a TGF- β jako jeho antagonist této aktivaci zabráňuje. Kromě toho TGF- β také inhibuje proliferaci NK-buněk. Na rozdíl od T-lymfocytů ale u NK-buněk nebyl prokázán efekt TGF- β na jejich přežívání (Wilson et al., 2011).

4.3.7. Vytváření specifického prostředí pro nádorové kmenové buňky

Problematika nádorových kmenových buněk je poměrně nová, a proto se i většina zatím publikovaných výzkumů soustřeďuje na základní principy jejich vzniku a regulace. Studie jsou přitom často inspirovány fakty známými z výzkumu normálních kmenových buněk.

Všechny kmenové buňky potřebují pro udržení svých jedinečných vlastností specifické prostředí. V první řadě to znamená, že jsou tyto buňky udržovány v nediferencovaném stavu a je potlačován jejich přechod do senescence. Všechny buňky (včetně těch kmenových) disponují mechanismy kontrolujícími poškozenou a neopravenou DNA. Jsou-li taková poškození zjištěna, spustí se mechanismy vedoucí k diferenciaci, senescenci (např. přes tumor supresorový protein p53) a následnému odstranění poškozené buňky z tkáně (Collado et al., 2007). V případě nádorových kmenových buněk jsou tyto kontrolní mechanismy velmi často inaktivovány a nádorové mikroprostředí pro ně vytváří podmínky, které je udržuje v nediferencovaném stavu.

Mezi základní regulátory diferenciaci kmenových buněk patří BMPs (bone morphogenetic proteins) a jejich antagonisté. BMP podporuje diferenciaci kmenových buněk a tím reguluje i jejich počet. Jeho antagonisté naopak diferenciaci kmenových buněk brání (Zhang and Li, 2005). BMPs i jejich antagonisté jsou exprimovány ve zdravých i nádorových tkáních. Studie analyzující a porovnávající míru exprese jednotlivých zástupců ve zdravých a nádorových tkáních ale identifikovaly i antagonisty BMP, kteří jsou ve zvýšené míře produkováni pouze v nádorových tkáních. Mezi ně patří např. Gremlin 1. Analýza RNA ve vzorcích získaných ze 774 nádorů zjistila, že Gremlin 1 je exprimován ve více než 50 % vzorků nádoru močového měchýře, prsu, tlustého střeva, plic nebo slinivky. Gremlin 1 byl detekován i u dalších typů nádorů. Gremlin 1 byl navíc exprimován téměř výhradně stromálními buňkami. Současně je ale nutné zmínit, že přidání samotného Gremlin 1 do média není postačující k vytvoření dlouhodobé sebeobnovující se buněčné kultury (Sneddon et al., 2006). Ke vzniku a fungování tohoto specifického prostředí je tak nutná kooperace více faktorů a zřejmě i více buněčných typů podílejících se na jeho stavbě.



Obr. 8 Srovnání vlivu BMP a jeho antagonistů na kmenové buňky. BMP indukuje diferenciaci kmenových buněk, jeho antagonisté diferenciaci brání a udržují kmenové buňky v jejich prostředí (nice) a podporují jejich sebeobnovování. Obecný princip vlivu BMP a jeho antagonistů je obdobný v normálních i nádorových kmenových buňkách (Sneddon et al., 2006).

Poměrně nedávno byly publikovány další mechanismy, jak se CAFs mohou podílet na udržování kmenového fenotypu nádorových buněk – např. prostřednictvím aktivace HGF/c-Met (van Leenders et al., 2011) nebo produkcí kolagenu typu I (jakožto složky ECM). Na příkladu nádorových kolorektálních buněk byl popsán podíl receptoru pro kolagen, $\alpha 2\beta 1$ integrinu, na regulaci diferenciaci nádorových buněk. Kolagen typu I (součást ECM) tak u nádorových buněk prostřednictvím své vazby s receptorem ($\alpha 2\beta 1$ integrinem) indukuje

jejich epiteliálně-mesenchymální transformaci, přičemž tyto buňky získávají fenotyp kmenových buněk, a účinně brání jejich další diferenciaci (Kirkland, 2009).

Pro připomenutí je vhodné zmínit, že ECM a integriny sehrávají důležitou úlohu i při potlačování vstupu nádorových buněk do apoptózy. Vlivy jednotlivých faktorů se tak prolínají a až jejich celkový efekt formuje účinný pro-tumorogenní mechanismus vytvářený nádorovým mikroprostředím.

4.4 Možnosti terapie

S čím dál větším významem, který je připisován nádorovému mikroprostředí, si získávají větší pozornost i nové terapeutické metody a léky cílené na toto mikroprostředí. V předchozím textu byl popsán rozsáhlý vliv CAFs na nádor v různých fázích jeho vývoje skrze různé procesy (podporu proliferace a inhibici drah vedoucích k buněčné smrti, podporu angiogeneze, podporu migrace nádorových buněk a vznik metastáz). Samotné možnosti léčby jsou potom směřovány:

- proti samotné diferenciaci a vzniku CAFs (jejíž výzkum se nachází teprve na svém počátku)
- nebo interakcím CAFs s jejich okolím (nádorovými buňkami, extracelulární matrix, dalšími buňkami).

Mezi současný široce zkoumaný cíl potenciálních léků patří FAP/sepráza. Výhodou tohoto proteinu je jeho velmi specifická lokalizace – zatímco u zdravých tkání se téměř nevyskytuje – s výjimkou během embryonálního vývoje, hojení ran nebo zánětlivých reakcí (Aertgeerts et al., 2005), v naprosté většině epiteliálních nádorů je tento protein exprimován, což z něj dělá velmi slibný cíl pro léčbu nádorových onemocnění bez zbytečné zátěže pro zdravé buňky. Publikované výzkumy zaznamenaly potlačení růstu nádoru u myši při aplikaci různých inhibitorů enzymatické aktivity FAP (Santos et al., 2009). Klinické testy inhibitorů FAP (sibrotuzumab (Scott et al., 2003), Talabostat (Narra et al., 2007)) u lidí zatím ale nepřinesly uspokojivé výsledky.

Z dalších zkoumaných a testovaných přístupů k léčbě cílené na CAFs je možné zmínit např. inhibitory HGF/Met signalizace, která nádor ovlivňuje ve více bodech – podporuje angiogenezi, invazivitu i jeho růst. I její inhibitory (např. NK4 protein, AMG102 nebo trombospondin-1) tak mají širší uplatnění. NK4 (N-terminal hairpin domain and kringle domain) protein působí jako antagonist HGF a účinkuje tak pouze na autokrinně nebo

parakrinně aktivovanou Met signalizační dráhu. Dle publikovaných výsledků má NK4 inhibiční účinky na růst i invazivitu prostatických nádorových buněk *in vitro* a indukuje u nich vstup do apoptózy (Yue et al., 2010). Inhibiční účinky na růst nádoru byly pozorovány i u buněk spinocelulárního karcinomu léčených kombinací NK4 a cisplatiny (Matsumoto et al., 2011). Působení AMG102 je velmi podobné, brání vazbě HGF a Met receptoru (Jun et al., 2007). V současnosti probíhají klinické testy AMG102 (i v kombinaci s jinými látkami) u pacientů s diagnostikovanou rakovinou ledvin, žaludku, prostaty aj. Trombospondin-1 působí ě jako přirozený inhibitor angiogeneze. Váže se specificky na povrchový protein endoteliálních buněk, ve kterých indukuje apoptózu. Protože je ale molekula trombospondinu-1 pro účely terapie příliš velká, hledají se její analogy, které by si zachovávaly účinky původní látky. Některé analogy již byly identifikovány a jsou zkoumány v rámci klinických testů např. pacientů s diagnózou nádorů plic (Aggarwal et al., 2012).

V předchozím textu byl zmíněn široký rozsah pro-tumorogenního působení SDF-1 (CXCL12). I jeho inhibice se proto stala cílem výzkumu nových léků. Například léčba rakoviny vaječníků na myších modelech pomocí AMD3100 blokujícího interakci SDF-1/CXCR4 vedla k inhibici růstu rakovinných buněk (Ray et al., 2011). AMD3100 v kooperaci s jinými přípravky je v současnosti testován v rámci klinických testů.

Mnoho potenciálních léků cílených na nádorové mikroprostředí je stále ve fázi testů v laboratořích, většina z nich ani nedosáhne fáze klinických testů. Přesto se některé z těchto léků úspěšně používají (většinou spolu s klasickou chemoterapeutickou léčbou a ozařováním) a vývoj dalších podobných léků může současnou léčbu nádorových onemocnění značně zefektivnit.

5. DISKUZE

Vznik a vývoj nádorového onemocnění je geneticky a také prostředím ovlivnitelný a regulovaný proces, na kterém se podílí mnoho různých faktorů. Mezi tyto faktory nepochybně patří i tzv. nádorového mikroprostředí, jehož role během tumorogeneze byla prokázána již před mnoha lety. Především kvůli svému potenciálnímu využití ve vývoji nových léků a terapeutických metod si nyní toto téma získalo značnou pozornost v primárním i aplikovaném výzkumu.

V posledních letech bylo o nádorovém mikroprostředí, stejně tak i o nádorových fibroblastech, publikováno velké množství článků a některé z nich změnily pohled na do té doby uznávané teorie o fyziologických mechanismech probíhajících v nádorových buňkách. Příkladem toho je článek publikovaný v roce 2008, ve kterém byla popsána účast nádorových fibroblastů na pozmeněném metabolismu nádorových buněk (Vincent et al., 2008). Původní hypotéza obecně přijímaná po desítky let definovala tzv. Warburgův efekt (Warburg, 1956), který byl ale připisován pouze vlastním nádorovým buňkám. Během zmíněného novějšího výzkumu byl ale i v tomto bodě identifikován příspěvek nádorového mikroprostředí (především nádorových fibroblastů), které se na metabolismu nádorových buněk ve velké míře podílí a umožňují jim tak získávat energii mnohem efektivněji. Toto pozorování má za následek přinejmenším dvě důležité implikace: 1) potvrzuje velmi úzkou kooperaci nádorových buněk a nádorového mikroprostředí a velkou míru, kterou jsou nádorové buňky schopny toto prostředí přetvářet k vlastním potřebám a 2) ukazuje na další možnou léčbu nádorů mířenou na omezení zdrojů energie pro nádorové buňky.

Další ze široce zkoumaných témat spojených s nádorovými fibroblasty představuje existence nádorových kmenových buněk. Velká část předpokládaných mechanismů vzniku i regulace nádorových kmenových buněk je odvozena od již lépe popsaných normálních kmenových buněk. Obecné principy regulace diferenciací jsou pokládány v obou typech kmenových buněk za obdobné – existuje specializované mikroprostředí (nika), ve kterém je udržován kmenový charakter místních buněk, a po přijetí pro-diferenciačního signálu se tyto buňky diferencují a niku opouští (Calabrese et al., 2007). Byly popsány faktory účastnící se těchto procesů v normálních i nádorových kmenových buňkách. Postupně jsou ale s pomocí analýz exprimovaných proteinů identifikovány faktory specifické pro regulaci nádorových kmenových buněk (např. zmíněný Gremlin-1) (Sneddon et al., 2006), které se tak nabízejí jako možné cíle pro onkologickou terapii. Mechanismus vzniku tohoto mikroprostředí je však

stále nejasný – zda vzniká v reakci na faktory produkované nádorovými buňkami, nebo je toto prostředí zformováno vzájemnou komunikací mezi nádorovými buňkami a jejich okolím. Problémy spojené s výzkumem nádorových kmenových buněk a jejich mikroprostředí vyplývají z obtížné kultivovatelnosti těchto buněk a v neposlední řadě i ne vždy jednoznačné identifikace nádorových kmenových buněk. Podrobnější znalosti o nádorových kmenových buňkách jsou proto z hlediska dalšího výzkumu jejich regulace nádorovým mikroprostředím velmi důležité.

Co se ostatních funkcí CAFs týče, byla v posledních letech poměrně dobře popsána řada faktorů sekretovaných CAFs včetně směrů jejich působení. Byl demonstrován jejich pro-nádorový efekt a současně byly navrženy možnosti inhibice jimi aktivovaných drah, např. látky potlačující tvorbu cévního zásobení u nádorů ledvin (Gordon, 2004, Courtney and Choueiri, 2010). Ačkoliv některé z těchto inhibitorů fungovaly relativně dobře v *in vitro* podmínkách, žádaného efektu při aplikaci na zvířecích modelech nebo i lidech bylo dosaženo jen u malého zlomku těchto látek. To je zřejmě důsledek provázanosti vlivů všech složek nádorového mikroprostředí a jimi produkovaných faktorů. Chemokiny, cytokiny, růstové faktory, proteázy atd. produkované CAFs a ostatními složkami nádorového mikroprostředí vytváří rozsáhlé signální sítě. Oblasti jejich působení se překrývají, řada faktorů navíc působí současně na více procesů napomáhajících rozvoji nádoru, např. TGF- β , SDF-1, HGF aj. Dráhy aktivované těmito faktory mohou být navíc konstitutivně aktivované i mutacemi v dalších místech těchto signálních drah. Například již zmíněný NK4, antagonist HGF, účinně inhibuje autokrinně a parakrinně aktivovanou HGF/Met signální dráhu, čímž omezuje proliferaci, migraci i invazivitu nádorových buněk (Yue et al., 2010). Tato dráha může být ale konstitutivně aktivována i jiným způsobem, např. mutacemi v Met-receptoru, a v těchto případech je použití NK4 z hlediska blokace této dráhy zcela neúčinné. Nádor tak představuje velmi komplexní orgán. Nejen jednotlivé nádorové typy, ale i jednotlivé vzorky z různých pacientů vykazují velkou heterogenitu. Před hodnocením výsledků studií je proto nutné analyzovat i další možné faktory ovlivňující aktivaci studovaných drah a účinnost jejich inhibitorů, potenciálních léků.

I přes velký pokrok a množství publikovaných článků tak zůstává k dalšímu studiu otevřená celá řada otázek kolem funkce nádorových fibroblastů i ostatních složek nádorového mikroprostředí v dějích doprovázejících vznik a rozvoj nádoru.

6. ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo shrnout dosavadní poznatky o vlivu nádorových fibroblastů (CAFs) na nádor. CAFs vznikají přeměnou stávajících fibroblastů nebo jiných buněčných typů (epiteliálních buněk, endoteliálních buněk, mesenchymálních kmenových buněk aj.). Tato přeměna je indukovaná faktory produkovanými nádorovými buňkami (především TGF- β). Lokální fibroblasty zpočátku rozvoji nádoru, víceméně fyzicky, brání. Vlivem faktorů produkovaných nádorovými buňkami ale fibroblasty mění svou morfologii a začínají produkovat množství faktorů, které růst nádoru naopak podporují.

- V první řadě CAFs podporují proliferaci nádorových buněk a brání jejich vstupu do apoptózy. Tím přispívají k rychlému namnožení nádorových buněk a způsobují jejich sníženou citlivost k cytotoxickým látkám.
- S růstem nádoru se zvyšují i jeho nároky na dostupné živiny. CAFs v tomto ohledu sekretují řadu angiogenních faktorů, včetně klasického VEGF, nebo faktorů chemotakticky působících na prekursorů endoteliálních buněk.
- Funkcí typickou pro CAFs je podpora invazivity nádoru především remodelací extracelulární matrix, čímž CAFs hrají roli vodících buněk, které vytvářejí nádorovým buňkám místo pro jejich další expanzi.
- Nádorové buňky získávají od CAFs vysokoenergetické substráty pro svůj metabolismus (laktát a pyruvát), který je tak rychlejší a efektivnější.
- CAFs produkují faktory inhibující činnost cytotoxických T-lymfocytů a NK-buněk, čímž potlačují odpověď imunitního systému a brání zničení nádorových buněk tímto systémem.
- V neposlední řadě se CAFs podílí na vytvoření prostředí, které brání diferenciaci nádorových kmenových buněk a v již diferencovaných buňkách může indukovat epiteliálně-mesenchymální přechod, prostřednictvím kterého mohou tyto buňky fenotyp kmenových buněk získat.

Vliv CAFs na přežívání, proliferaci a invazivitu nádorových buněk je tak nepopiratelný a stal se i cílem řady terapeutických přístupů v onkologii. Přestože se většinou jedná o látky doplňující klasickou léčbu (chemoradioterapii), jejich význam je značný, protože u pacientů snižují rezistenci vůči ostatním lékům i riziko relapsu.

7. SEZNAM ZKRATEK

ALL	acute lymphoblastic leukemia; akutní lymfoblastická leukémie
ATP	adenosine triphosphate; adenosintrifosfát
Bad	Bcl-2-associated death promoter
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
bFGF	basic fibroblast growth factor, bazický fibroblastový růstový faktor
BMP	bone morphogenetic protein; kostní morfogenetický protein
CAFs	cancer associated fibroblasts; nádorové fibroblasty
Cav-1	caveolin-1
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2
CD31/PECAM	cluster of differentiation 31/platelet endothelial cell adhesion molecule
CD47	cluster of differentiation 47
CSCs	cancer stem cells; nádorové kmenové buňky
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4
ECM	extracellular matrix; extracelulární matrix
E-DA	ectodysplasin-A
EGFs	epidermal growth factor; epidermální růstový faktor
EMT	epithelial mesenchymal transition; epiteliálně-mesenchymální přechod
EndMT	endothelial mesenchymal transition; endoteliální-mesenchymální přechod
FAP	fibroblast activation protein
FGFs	fibroblast growth factor; fibroblastový růstový faktor
FSP-1	fibroblast specific protein
HGF	hepatocyte growth factor
HIF	hypoxia-inducible factor; hypoxický indukibilní faktor
IGF	insulin-like growth factor; inzulínu podobný růstový faktor
IL-6/8/15	interleukin-6/8/15
MAPK	mitogen-activated protein kinase; mitogenem aktivovaná proteinkináza
Met receptor	hepatocyte growth factor receptor
MMPs	matrix metalloproteinases, matrix metaloproteázy
MMT	mesenchymal mesenchymal transition; mesench.-mesenchymální přechod
NK4	N-terminal hairpin domain and kringle domain
NK-buňky	natural-killer cells
PDGF	platelet-derived growth factor; růstový faktor z destiček

PI3K	phosphatidylinositol 3-kinases; fosfatidylinositol-3-kináza
Akt	protein kinase B; proteinkináza B
PKM1/2	pyruvate kinase muscle isozyme 1/2; M1/M2 pyruvát kinázy
ROS	reactive oxygen species; reaktivní kyslíkové radikály
SDF-1/CXCL12	stromal cell-derived factor-1/ chemokine (C-X-C motif) ligand 12; chemokinový faktor-1 odvozený od stromálních buněk
TAMs	tumor associated macrophages; nádorové makrofágy
TGF- β	transforming growth factor- β ; transformující růstový faktor- β
uPA/uPAR	urokinase-type plasminogen activator/urokinase receptor; urokináza/urokinázový receptor
VEGF	vascular endothelial growth factor; vaskulární endotelový růstový faktor
α/γ -SMA	α/γ smooth muscle actin

8. CITOVANÁ LITERATURA

Aertgeerts K, Levin I, Shi L, Snell GP, Jennings A, Prasad GS, Zhang Y, Kraus ML, Salakian S, Sridhar V, Wijnands R, Tennant MG. 2005. Structural and Kinetic Analysis of the Substrate Specificity of Human Fibroblast Activation Protein alpha. *Journal of Biological Chemistry*. 280(20): 19441-4.

Aggarwal C, Somaiah N, Simon G. 2012. Antiangiogenic agents in the management of non-small cell lung cancer: Where do we stand now and where are we headed? *Cancer Biology & Therapy*. 13(5): 247-63.

Allen N, Newton R, Gonzalez AB, Green J, Banks E, Key TJ. 2005. The causes of cancer. Selby P., Knowles M. *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*. Oxford University Press. 25-44.

Anand P, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, Sung B, Aggarwal BB. 2008. Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharmaceutical Research*. 25(9): 2097-116.

Ansieau S, Bastid J, Doreau A, Morel AP, Bouchet BP, Thomas C, Fauvet F, Puisieux I, Doglioni C, Piccinin S, Maestro R, Voeltzel T, Selmi A, Valsesia-Wittmann S, Caron de Fromental C, Puisieux A. 2008. Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer Cell*. 14(1): 79-89.

Bi WR, Yang CQ, Shi Q. 2012. Transforming Growth Factor- β 1 Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Hepatic Fibrosis. *Hepatogastroenterology*. 59(118).

Bonnet, D., Dick, J.E. 1997. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine*. 3(7): 730-37.

Bonuccelli G, Whitaker-Menezes D, Castello-Cros R, Pavlides S, Pestell RG, Fatatis A, Witkiewicz AK, Vander Heiden MG, Migneco G, Chiavarina B, Frank PG, Capozza F, Flomenberg N, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP. 2010. The reverse Warburg effect: glycolysis inhibitors prevent the tumor promoting effects of caveolin-1 deficient cancer associated fibroblasts. *Cell Cycle*. 9(10): 1960-71.

Burger JA, Kipps TJ. 2006. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood*. 107(5): 1761-67.

Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C, Hamner B, Oh EY, Gaber MW, Finklestein D, Allen M, Frank A, Bayazitov IT, Zakharenko SS, Gajjar A, Davidoff A, Gilbertson RJ. 2007. A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell*. 11(1): 69-82.

Cat B, Stuhlmann D, Steinbrenner H, Alili L, Holtkötter O, Sies H, Brenneisen P. 2006. Enhancement of tumor invasion depends on transdifferentiation of skin fibroblasts mediated by reactive oxygen species. *Journal of Cell Science*. 119(Pt 13): 2727-38.

Cirri P, Chiarugi P. 2011. Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *American Journal of Cancer Research*. 1(4): 482-97.

Collado M, Blasco MA, Serrano M. 2007. Cellular senescence in cancer and aging. Review. *Cell*. 130(2): 223-33.

Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. 2009. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*. 30(7): 1073-81.

Courtney KD, Choueiri TK. 2010. Updates on novel therapies for metastatic renal cell carcinoma. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. 2(3): 209-19.

Crawford Y, Kasman I, Yu L, Zhong C, Wu X, Modrusan Z, Kaminker J, Ferrara N. 2009. PDGF-C mediates the angiogenic and tumorigenic properties of fibroblasts associated with tumors refractory to anti-VEGF treatment. *Cancer Cell*. 15(1): 21-34.

- Darby IA, Bisucci T, Hewitson TD, MacLellan DG. 1997.** Apoptosis is increased in a model of diabetes-impaired wound healing in genetically diabetic mice. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 29(1): 191-200.
- De Bock K, Cauwenberghs S, Carmeliet P. 2011.** Vessel abnormalization: another hallmark of cancer? Molecular mechanisms and therapeutic implications. Review. *Current opinion in genetics & development*. 21(1): 73-9.
- Denk PO, Hoppe J, Hoppe V, Knorr M. 2003.** Effect of growth factors on the activation of human Tenon's capsule fibroblasts. *Current Eye Research*. 27(1): 35-44.
- Desmouliere A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. 1995.** Apoptosis mediated the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *American Journal of Pathology*. 146(1): 56-66.
- di Tomaso E, London N, Fuja D, Logie J, Tyrrell JA, Kamoun W, Munn LL, Jain RK. 2009.** PDGF-C induces maturation of blood vessels in a model of glioblastoma and attenuates the response to anti-VEGF treatment. *PLoS One*. 4(4): e5123.
- Dolberg DS, Hollingsworth R, Hertle M, Bissell MJ. 1985.** Wounding and its role in RSV-mediated tumor formation. *Science*. 230(4726): 676-8.
- Egeblad M, Littlepage LE, Werb Z. 2005.** The Fibroblastic Coconspirator in Cancer Progression. Review. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 70: 383-8.
- Erren, M, Mantovani A, Allavena P. 2011.** Tumor-associated Macrophages (TAM) and Inflammation in Colorectal Cancer. *Cancer microenvironment: official journal of the International Cancer Microenvironment Society*. 4(2): 141-54.
- Estrugo D, Fischer A, Hess F, Scherthan H, Belka C, Cordes N. 2007.** Ligand bound beta1 integrins inhibit procaspase-8 for mediating cell adhesion-mediated drug and radiation resistance in human leukemia cells. *PLoS One*. 2(3): e269.
- Eyden B, Banerjee SS, Shenjere P, Fisher C. 2009.** The myofibroblast and its tumours. Review. *Journal of Clinical Pathology*. 62(3): 236-49.
- Flavell RA, Sanjabi S, Wrzesinski SH, Licona-Limón P. 2010.** The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta. Review. *Nature Reviews. Immunology*. 10(8): 554-67.
- Folkman, J. 1971.** Tumor angiogenesis: therapeutic implications. Review. *The New England Journal of Medicine*. 285(21): 1182-6.
- Frederick BA, Helfrich BA, Coldren CD, Zheng D, Chan D, Bunn PA Jr, Raben D. 2007.** Epithelial to mesenchymal transition predicts gefitinib resistance in cell lines of head and neck squamous cell carcinoma and non-small cell lung carcinoma. *Molecular Cancer Therapeutics*. 6(6): 1683-91.
- Gao MQ, Kim BG, Kang S, Choi YP, Park H, Kang KS, Cho NH. 2010.** Stromal fibroblasts from the interface zone of human breast carcinomas induce an epithelial-mesenchymal transition-like state in breast cancer cells in vitro. *Journal of Cell Science*. 123(Pt 20): 3507-14.
- Garin-Chesa P, Old LJ, Rettig WJ. 1990.** Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers. *National Proceedings of the Academy of Science of the United States*. 87(18): 7235-9.
- Garvalov BK, Acker T. 2011.** Cancer stem cells: a new framework for the design. Review. *Journal of Molecular Medicine*. 89(2): 95-107.
- Giannoni E, Bianchini F, Masieri L, Serni S, Torre E, Calorini L, Chiarugi P. 2010.** Reciprocal activation of prostate cancer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness. *Cancer Research*. 70(17): 6945-56.
- Gordon MS. 2004.** Novel antiangiogenic therapies for renal cell cancer. *Clinical Cancer Research*. 10(18 Pt 2): 6377S-81S.

- Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu GY, Vallabhapurapu S, Scheller J, Rose-John S, Cheroutre H, Eckmann L, Karin M. 2009.** IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell*. 15(2): 103-13.
- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. 2010.** Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 140(6): 883-99.
- Hanahan D, Coussens LM. 2012.** Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*. 21(3): 309-322.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2011.** Hallmarks of cancer: the next generation. Review. *Cell*. 144(5): 646-74.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2000.** The hallmarks of cancer. *Cell*. 100(1): 57-70.
- Henry LR, Lee HO, Lee JS, Klein-Szanto A, Watts P, Ross EA, Chen WT, Cheng JD. 2007.** Clinical Implications of Fibroblast Activation Protein in Patients with Colon Cancer. *Clinical Cancer Research*. 13(6): 1736-41.
- Horton SJ, Huntly BJ. 2012.** Recent advances in acute myeloid leukemia stem cell biology. *Haematologica*.
- Chaffer CL, Weinberg RA. 2011.** A perspective on cancer cell metastasis. Review. *Science*. 331(6024): 1559-64.
- Chao C, Carmical JR, Ives KL, Wood TG, Aronson JF, Gomez GA, Djukom CD, Hellmich MR. 2012.** CD133+ colon cancer cells are more interactive with the tumor microenvironment than CD133- cells. *Laboratory Investigation*. 92(3): 420-36.
- Chao MP, Alizadeh AA, Tang C, Jan M, Weissman-Tsukamoto R, Zhao F, Park CY, Weissman IL, Majeti R. 2011.** Therapeutic antibody targeting of CD47 eliminates human acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Research*. 71(4): 1374-84.
- Chao MP, Alizadeh AA, Tang C, Myklebust JH, Varghese B, Gill S, Jan M, Cha AC, Chan CK, Tan BT, Park CY, Zhao F, Kohrt HE, Malumbres R, Briones J, Gascoyne RD, Lossos IS, Levy R, Weissman IL, Majeti R. 2010/b.** Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis and eradicate non-Hodgkin lymphoma. *The Cell*. 142(5): 699-733.
- Chao MP, Jaiswal S, Weissman-Tsukamoto R, Alizadeh AA, Gentles AJ, Volkmer J, Weiskopf K, Willingham SB, Raveh T, Park CY, Majeti R, Weissman IL. 2010/a.** Calreticulin is the dominant prophagocytic signal on multiple human cancers and is counterbalanced by CD47. *Science Translational Medicine*. 2(63): 63ra94.
- Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE, Wei R, Fleming MD, Schreiber SL, Cantley LC. 2008.** The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature*. 452(7184): 230-3.
- Iivanainen E, Kahari VM, Heino J, Elenius K. 2003.** Endothelial cell-matrix interactions. Review. *Microscopy Research and Technnique*. 60(1): 13-22.
- Jun HT, Sun J, Rex K, Radinsky R, Kendall R, Coxon A, Burgess TL. 2007.** AMG 102, a fully human antihepatocyte growth factor/scatter factor neutralizing antibody, enhances the efficacy of temozolomide or docetaxel in U-87 MG cells and xenografts. *Clinical Cancer Research*. 13(22, Pt 1): 6735-42.
- Kalluri R, Weinberg RA. 2009.** The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*. 119(6): 1420-8.
- Kirkland, SC. 2009.** Type I collagen inhibits differentiation and promotes a stem cell-like phenotype in human colorectal carcinoma cells. *British Journal of Cancer*. 101(2): 320-6.
- Knowles LM, Stabile LP, Egloff AM, Rothstein ME, Thomas SM, Gubish CT, Lerner EC, Seethala RR, Suzuki S, Quesnelle KM, Morgan S, Ferris RL, Grandis JR, Siegfried JM. 2009.** HGF and c-Met participate in paracrine tumorigenic pathways in head and neck squamous cell cancer. *Clinical Cancer Research*. 15(11): 3740-50.
- Kojima Y, Acar A, Eaton EN, Mellody KT, Scheel C, Ben-Porath I, Onder TT, Wang ZC, Richardson AL, Weinberg RA, Orimo A. 2010.** Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1

(SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*. 107(46): 20009-14.

Kumar R, Fidler IJ. 1998. Angiogenic molecules and cancer metastasis. Review. *In Vivo*. 5(16): 27-34.

Lebret SC, Newgreen DF, Thompson EW, Ackland ML. 2007. Induction of epithelial to mesenchymal transition in PMC42-LA human breast carcinoma cells by carcinoma-associated fibroblast secreted factors. *Breast Cancer Research*. 9(1): R19.

Lederle W, Hartenstein B, Meides A, Kunzelmann H, Werb Z, Angel P, Mueller MM. 2010. MMP13 as a stromal mediator in controlling persistent angiogenesis in skin carcinoma. *Carcinogenesis*. 31(7): 1175-84.

Lee KH, Choi EY, Hyun MS, Jang BI, Kim TN, Lee HJ, Eun JY, Kim HG, Yoon SS, Lee DS, Kim JH, Kim JR. 2008. Role of hepatocyte growth factor/c-Met signaling in regulating urokinase plasminogen activator on invasiveness in human hepatocellular carcinoma: a potential therapeutic target. *Clinical & Experimental Metastasis*. 25(1): 89-96.

Lenci RE, Rachakonda PS, Kubarenko AV, Weber AN, Brandt A, Gast A, Sucker A, Hemminki K, Schadendorf D, Kumar R. 2012. Integrin genes and susceptibility to human melanoma. *Mutagenesis*. 27(3): 367-373. Published Online Dec 20, 2011.

Lewis DA, Travers JB, Somani AK, Spandau DF. 2010. The IGF-1/IGF-1R signaling axis in the skin: a new role for the dermis in aging-associated skin cancer. *Oncogene*. 29(10): 1475-85.

Lloret M, Lara PC, Bordón E, Pinar B, Rey A, Falcón O, Molano F, Hernández MA. 2007. IGF-1R expression in localized cervical carcinoma patients treated by radiochemotherapy. *Gynecologic Oncology*. 106(1): 8-11.

Martins VL, Caley M, O'Toole EA. 2012. Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair. *Cell and Tissue Repair*.

Matsumoto G, Omi Y, Lee U, Kubota E, Tabata Y. 2011. NK4 gene therapy combined with cisplatin inhibits tumour growth and metastasis of squamous cell carcinoma. *Anticancer Research*. 31(1): 105-11.

Mentlein R, Hattermann K, Hemion C, Jungbluth AA, Held-Feindt J. 2011. Expression and role of the cell surface protease seprase/fibroblast activation protein- α (FAP- α) in astroglial tumors. *Biological Chemistry*. 392(2): 199-207.

Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. 2010. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 70(24): 117-34.

Motlík J, Klíma J, Dvoránková B, Smetana K Jr. 2007. Porcine epidermal stem cells as a biomedical model for wound healing and normal/malignant epithelial cell propagation. Review. *Theriogenology*. 67(1): 105-11.

Narra K, Mullins SR, Lee HO, Strzemkowski-Brun B, Magalong K, Christiansen VJ, McKee PA, Egleston B, Cohen SJ, Weiner LM, Meropol NJ, Cheng JD. 2007. Phase II trial of single agent Val-boroPro (Talabostat) inhibiting Fibroblast Activation Protein in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Biology & Therapy*. 6(11): 1691-9.

Naumov GN, Akslen LA, Folkman J. 2006. Role of angiogenesis in human tumor dormancy: animal models of the angiogenic switch. Review. *Cell Cycle*. 5(16) 1779-87.

Niessen K, Fu Y, Chang L, Hoodless PA, McFadden D, Karsan A. 2008. Slug is a direct Notch target required for initiation of cardiac cushion cellularization. *The Journal of Cell Biology*. 182(2): 315-25.

Nirodi CS, Devalaraja R, Nanney LB, Arrindell S, Russell S, Trupin J, Richmond A. 2000. Chemokine and chemokine receptor expression in keloid and normal fibroblasts. *Wound Repair and Regeneration*. 8(5): 371-82.

- Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR. 1999.** Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Research*. 59(19): 5002-11.
- Omori I, Zaidan Dagli ML, Yamakage K, Yamasaki H. 2001.** Involvement of gap junctions in tumor suppression. analysis of genetically-manipulated mice. Review. *Mutation Research*. 477(1-2): 191-6.
- Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA. 2005.** Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*. 121(3): 335-48.
- Pavlidis S, Vera I, Gandara R, Sneddon S, Pestell RG, Mercier I, Martinez-Outschoorn UE, Whitaker-Menezes D, Howell A, Sotgia F, Lisanti MP. 2012.** Warburg Meets Autophagy: Cancer-Associated Fibroblasts Accelerate Tumor Growth and Metastasis via Oxidative Stress, Mitophagy, and Aerobic Glycolysis. *Antioxidants & Redox Signaling*. 16(11): 1264-84.
- Pavlidis S, Whitaker-Menezes D, Castello-Cros R, Flomenberg N, Witkiewicz AK, Frank PG, Casimiro MC, Wang C, Fortina P, Addya S, Pestell RG, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP. 2009.** The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle*. 8(23): 3984-4001.
- Ping YF, Yao XH, Jiang JY, Zhao LT, Yu SC, Jiang T, Lin MC, Chen JH, Wang B, Zhang R, Cui YH, Qian C, Wang J, Bian XW. 2011.** The chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 promote glioma stem cell-mediated VEGF production and tumour angiogenesis via PI3K/AKT signalling. *The Journal of Pathology*. 224(3): 344-54.
- Quante M, Tu SP, Tomita H, Gonda T, Wang SS, Takashi S, Baik GH, Shibata W, Diprete B, Betz KS, Friedman R, Varro A, Tycko B, Wang TC. 2011.** Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer Cell*. 19(2): 257-72.
- Radisky DC, Kenny PA, Bissell MJ. 2007.** Fibrosis and Cancer: Do Myofibroblasts Come Also From Epithelial Cells Via EMT? *Journal of Cellular Biochemistry*. 101(4): 830-9.
- Ray P, Lewin SA, Mihalko LA, Schmidt BT, Luker KE, Luker GD. 2011.** Noninvasive imaging reveals inhibition of ovarian cancer by targeting CXCL12-CXCR4. *Neoplasia*. 13(12): 1152-61.
- Rodemann HP, Muller GA. 1991.** Characterization of human renal fibroblasts in health and disease. II. In vitro growth, differentiation, and collagen synthesis of fibroblasts from kidneys with interstitial fibrosis. *American Journal of Kidney Disease*. 117(6): 684-6.
- Sanjabi S, Mosaheb MM, Flavell RA. 2009.** Opposing effects of TGF-beta and IL-15 cytokines control the number of short-lived effector CD8+ T cells. *Immunity*. 31(1): 131-44.
- Santos AM, Jung J, Aziz N, Kissil JL, Puré E. 2009.** Targeting fibroblast activation protein inhibits tumor stromagenesis and growth in mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 119(12): 3613-25.
- Scott AM, Wiseman G, Welt S, Adjei A, Lee FT, Hopkins W, Divgi CR, Hanson LH, Mitchell P, Gansen DN, Larson SM, Ingle JN, Hoffman EW, Tanswell P, Ritter G, Cohen LS, Bette P, Arvay L, Amelsberg A, Vlock D, Rettig WJ, Old LJ. 2003.** A Phase I dose-escalation study of sibtrotuzumab in patients with advanced or metastatic fibroblast activation protein-positive cancer. *Clinical cancer research*. 9(5): 1639-47.
- Shi M, Yu DH, Chen Y, Zhao CY, Zhang J, Liu QH, Ni CR, Zhu MH. 2012.** Expression of fibroblast activation protein in human pancreatic adenocarcinoma and its clinicopathological significance. *World Journal of Gastroenterology*. 18(8): 840-6.
- Sneddon JB, Zhen HH, Montgomery K, van de Rijn M, Tward AD, West R, Gladstone H, Chang HY, Morganroth GS, Oro AE, Brown PO. 2006.** Bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is widely expressed by cancer-associated stromal cells and can promote tumor cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103(40): 14842-7.
- Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. 2002.** Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. Review. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 3(5): 349-63.

- Valenciano A, Henríquez-Hernández LA, Moreno M, Lloret M, Lara PC. 2012.** Role of IGF-1 Receptor in Radiation Response. *Translational Oncology*. 5(1): 1-9.
- van Leenders GJ, Sookhlall R, Teubel WJ, de Ridder CM, Reneman S, Sacchetti A, Vissers KJ, van Weerden W, Jenster G. 2011.** Activation of c-MET induces a stem-like phenotype in human prostate cancer. *PLoS One*. 6(11): e26753.
- Vincent AS, Phan TT, Mukhopadhyay A, Lim HY, Halliwell B, Wong KP. 2008.** Human skin keloid fibroblasts display bioenergetics of cancer cells. *Journal of Investigative Dermatology*. 128(3): 702-9.
- Vokurka M, Hugo J, a kol. 2007.** *Velký lékařský slovník. 6. vydání.* Maxdorf. ISBN: 80-7345-105-0.
- Vosseler S, Lederle W, Airola K, Obermueller E, Fusenig NE, Mueller MM. 2009.** Distinct progression-associated expression of tumor and stromal MMPs in HaCaT skin SCCs correlates with onset of invasion. *International Journal of Cancer*. 125(10): 2296-306.
- Waldner M, Schimanski CC, Neurath MF. 2006.** Colon cancer and the immune system: the role of tumor invading T cells. *World Journal of Gastroenterology*. 12(45): 7233-8.
- Walker, MR, Pattel KK, Stappenbeck TS. 2009.** The stem cell niche. Review. *Journal of Pathology*. 217(2): 169-80.
- Wang R, Chadalavada K, Wilshire J, Kowalik U, Hovinga KE, Geber A, Fligelman B, Leversha M, Brennan C, Tabar V. 2010.** Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature*. 468(7325): 829-33.
- Warburg O. 1956.** On the origin of cancer cells. *Science*. 123(3191): 309-314.
- Wilson EB, El-Jawhari JJ, Neilson AL, Hall GD, Melcher AA, Meade JL, Cook GP. 2011.** Human tumour immune evasion via TGF- β blocks NK cell activation but not survival allowing therapeutic restoration of anti-tumour activity. *PLoS One*. 2011, 6(9): e22842.
- Xouri G, Christian S. 2010.** Origin and function of tumor stroma fibroblasts. Review. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 21(1): 40-6.
- Yoshimatsu Y, Watabe T. 2011.** Roles of TGF- β signals in endothelial-mesenchymal transition during cardiac fibrosis. *International Journal of Inflammation*. Nov 2011.
- Yue D, Wang Y, Ma P, Li YY, Chen H, Wang P, Ren CS. 2010.** Effects of transferred NK4 gene on proliferation, migration, invasion and apoptosis of human prostate cancer DU145 cells. *Asian Journal of Andrology*. 12(3): 381-9.
- Zamecnik J. 2005.** The extracellular space and matrix of gliomas. *Acta Neuropathologica*. 110(5): 435-42.
- Zeisberg EM, Potenta S, Xie L, Zeisberg M, Kalluri R. 2007.** Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Research*. 67(21): 10123-8.
- Zhang J, Li L. 2005.** BMP signaling and stem cell regulation. Review. *Developmental Biology*. 284(1): 1-11.